



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Simon NICOLAS

le mercredi 21 septembre 2016

Titre :

Modulation de l'homéostasie glucidique par transfert de microbiote intestinal
chez la souris conventionnelle

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Physiopathologie

Unité de recherche :

Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC) - INSERM U1048 - Equipe 2

Directeur/trice(s) de Thèse :

Dr. Matteo SERINO

Jury :

Pr. Claude KNAUF - Président

Dr. Marc-Emmanuel DUMAS - Rapporteur

Dr. Philippe LANGELLA - Rapporteur

Pr. Jean LESAGE - Rapporteur

Dr. Max LAFONTAN - Examineur

Dr. Matteo SERINO - Directeur de thèse

« Une thèse sans bruit mais du tracas jusqu'au cou. »

Luc Etienne

Résumé

De nos jours, le changement de style de vie et la consommation excessive d'aliments riches en énergie sont associés avec l'augmentation majeure de l'incidence des maladies métaboliques comme l'obésité et le diabète de type 2. Le diabète de type 2 est caractérisé, entre autre, par une augmentation de la production hépatique de glucose responsable d'une hyperglycémie chronique. Durant ces 10 dernières années, plusieurs études ont suggéré que le microbiote intestinal pouvait être impliqué dans le développement des maladies métaboliques. Le microbiote intestinal est composé de plusieurs milliards de bactéries réparties en plus de 1000 espèces différentes qui colonisent le tractus digestif. Plusieurs études ont montré que certaines pathologies comme le diabète et l'obésité sont caractérisées par des altérations taxonomiques et fonctionnelles du microbiote intestinal. De plus, la colonisation de souris axéniques (*i.e.* dépourvues de microbiote) par un microbiote intestinal provenant de souris ou d'Hommes obèses/diabétiques est suffisante pour induire la pathologie. Ces résultats suggèrent que les modifications du microbiote intestinal retrouvées chez les patients obèses/diabétiques sont potentiellement impliquées dans le développement des maladies métaboliques.

Cependant, l'absence de microbiote intestinal chez les souris axéniques induit des altérations structurelles et fonctionnelles de l'intestin comme une hyperperméabilité intestinale ou un système immunitaire atrophié. Dans ces conditions, il est possible de se demander si les effets délétères induits par la colonisation des souris axéniques avec un microbiote modifié peuvent être observés chez des souris conventionnelles. Pour répondre à cette question nous avons développé un nouveau protocole de transfert de microbiote intestinal dans un modèle de souris conventionnelles. Nous avons transféré le microbiote contenu dans le caecum de souris obèses (« microbiote obèse ») et celui contenu dans le caecum de souris minces (« microbiote mince ») dans des souris conventionnelles non traitées aux antibiotiques. De manière surprenante, le transfert du « microbiote obèse » a induit une diminution de la glycémie à jeun associée à une baisse de la néoglucogenèse hépatique chez les souris transplantées. A l'inverse, le transfert du « microbiote mince » n'a pas modifié la néoglucogenèse. De plus, le transfert du « microbiote obèse » a induit des modifications taxonomiques et fonctionnelles du microbiote intestinal des souris transplantées. De manière intéressante, une fois nourries avec un régime hyperlipidique les souris ayant reçu le « microbiote obèse » ont conservé une glycémie à jeun plus faible que les souris non transplantées. Encore une fois, ce phénotype résulte d'une diminution de la production hépatique de glucose caractérisée par une baisse de l'activité des enzymes néoglucogéniques phosphoenolpyruvate carboxykinase et glucose-6-phosphatase. Par ailleurs, ces souris sont également moins grasses que les souris non transplantées. En conclusion, nous avons montré que le transfert d'un « microbiote obèse » peut moduler le métabolisme hépatique et prévenir l'augmentation de la néoglucogenèse hépatique normalement induite par le régime hyperlipidique chez des souris conventionnelles. Ces travaux de thèse ont montré d'une part, que la modification du microbiote intestinal de souris conventionnelles est possible par transfert de microbiote caecal. D'autre part et contre toutes attentes, ces résultats mettent en lumière que, contrairement aux observations faites chez les souris axéniques, le transfert d'un « microbiote obèse » dans une souris conventionnelle n'induit pas les phénotypes caractéristiques des maladies métaboliques. Par ailleurs, ce modèle de transfert caecal pourrait être utile pour la compréhension du rôle des bactéries intestinales sur le développement des maladies métaboliques.

Abstract

Nowadays, the change of lifestyle and increase in the consumption of high-calorie foods are associated with a marked rise of the prevalence of metabolic diseases, including obesity and type 2 diabetes. Type 2 diabetes is linked, at least in part, to an increase of hepatic glucose production responsible for a fasting hyperglycemia. In the past decade, an increasing body of evidence has proposed gut microbiota as a new factor contributing to these metabolic alterations. Gut microbiota consists of trillions of bacteria identifying more than 1000 different species that inhabit our intestine. A body of work has demonstrated that multiple pathologies such as type 2 diabetes and obesity are characterized by an altered proportion and activity of the gut microbiota. In addition, the colonization of germ-free mice with the gut microbiota from either obese/diabetic humans or obese/diabetic mice transfers the phenotype. These results suggest that the modifications of the gut microbiota found in obese/diabetic patients are a potential etiologic factor for those diseases.

Nevertheless, the lack of microbiota in germ-free mice determines both structural and functional alterations such as gut hyperpermeability and the atrophy of the immune system. Therefore, we could wonder whether the detrimental effects of the gut microbiota from obese/diabetic patients observed in germ-free mice may also be observed in healthy conventional mice. To address this issue, we have developed a new gut microbiota transferring process from conventional mice to other mice. We have transferred the cecal microbiota harvested from either obese ("obese microbiota") or lean ("lean microbiota") mice in antibiotic-free conventional mice. Surprisingly, the mice which received the "obese microbiota" had a reduced fasted glycaemia compared to the mice which received the "lean microbiota". This diminution could be attributed to a decrease of the hepatic gluconeogenesis since conversion from pyruvate to glucose and phosphoenolpyruvate carboxykinase activity were lower in the liver of mice which received the "obese microbiota". Conversely, the transfer of the "lean microbiota" did not affect the hepatic gluconeogenesis. In addition, the transfer of the "obese microbiota" changed gut microbiota composition and the microbiome of recipient mice. Interestingly, mice which received the "obese microbiota" and fed a high-fat diet still exhibited reduced fed and fasted glycaemia. Once again, this phenotype was due to a decrease of hepatic gluconeogenesis characterized by a diminution of phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase activity. In addition, the mice which received the "obese microbiota" had less adiposity compared to the non-transferred mice. Finally, we reported that transferring the "obese microbiota" impact on hepatic metabolism and prevent HFD-increase hepatic gluconeogenesis. On the one hand, these thesis works, have demonstrated that it is possible to modify the gut microbiota by our caecal transferring process. On the other hand, our results suggest that the transfer of the "obese microbiota" in conventional mice does not induced some characteristics of metabolic diseases contrary to that it is observed in germ-free mice. Furthermore, this kind of gut microbiota transferring process may be useful for a better understanding of the etiology of metabolic diseases.

Table des matières

RESUME	3
ABSTRACT	5
TABLE DES MATIERES	7
TABLE DES ILLUSTRATIONS	11
LISTE DES ABREVIATIONS.....	15
AVANT PROPOS.....	17
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	19
I- LE MICROBIOTE INTESTINAL.....	19
A. Généralités	19
B. Les « facteurs » qui régulent l'acquisition du microbiote intestinal.....	24
1) Comment le microbiote nous colonise-t-il ?	24
2) Le mode d'accouchement	25
3) Les conditions d'hygiène et l'environnement	26
C. Le régime alimentaire conditionne le microbiote tout au long de la vie	28
1) Influence du régime alimentaire du nouveau-né sur le développement du microbiote	28
2) Le régime alimentaire chez l'adulte et son impact sur le microbiote	29
D. Relation hôte-microbiote en physiologie	31
1) Influence du microbiote sur la physiologie de l'intestin	31
a. Microbiote et transit intestinal	31
b. Microbiote et barrière intestinale.....	32
i) Microbiote et mucus	33
ii) Microbiote et épithélium intestinal.....	34
iii) Microbiote et système immunitaire intestinal	36
2) Influence du microbiote sur la physiologie du foie	39
II- L'HOMEOSTASIE GLUCIDIQUE UNE QUESTION DE SURVIE	43
A. La régulation de la glycémie au cours du temps	45
1) L'arrivée du glucose contenu dans le bol alimentaire.....	45
a. L'absorption intestinale de glucose.....	45
b. L'intestin : bien plus qu'un « sac absorbant »	45
2) Gestion de l'hyperglycémie postprandiale.....	47
a. La captation du glucose par les cellules de l'organisme	47
b. Le devenir biochimique du glucose intracellulaire	48
i) L'oxydation du glucose à des fins énergétiques	50
ii) Le stockage du glucose sous forme de glycogène	51
3) Maintien de la glycémie à distance des repas.....	52
a. La glycogénolyse hépatique	53
b. La néoglucogenèse.....	53
i) Origine des précurseurs néoglucogéniques	55
ii) La régulation hormonale de la production endogène de glucose	57
iii) Communication inter-organes pour le contrôle de la néoglucogenèse	60
B. Le diabète.....	61
1) Généralités.....	61
2) Le diabète est une maladie inflammatoire chronique	64
3) Le foie: un organe clef dans l'installation de l'hyperglycémie	64
III- IMPLICATION DU MICROBIOTE INTESTINAL DANS LE DEVELOPPEMENT DES MALADIES METABOLIQUES	66

A. <i>Le microbiote intestinal est modifié au cours des maladies métaboliques</i>	66
B. <i>Comment le microbiote intestinal participe-t-il au développement des maladies métaboliques ?</i>	69
1) Le modèle de souris axéniques	69
2) Le microbiote transforme le contenu luminal intestinal	70
a. La fermentation des polysaccharides par le microbiote	70
b. Le microbiote ne métabolise pas uniquement les fibres alimentaires	73
c. Métabolisme des acides biliaires par le microbiote	74
3) Régulation de la perméabilité intestinale et de l'inflammation au cours des maladies métaboliques	75
C. <i>Le microbiote intestinal : une cible thérapeutique pour le traitement des maladies métaboliques ?</i>	77
1) Les probiotiques et les prébiotiques	77
2) La transplantation fécale	78
OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE	87
MATERIELS ET METHODES	89
RESULTATS	97
I- EFFET DU TRANSFERT DU MICROBIOTE ISSU DE SOURIS OBESES ET MINCES SUR LE METABOLISME DES SOURIS RECEVEUSES	97
A. <i>Analyses des suspensions bactériennes de gavage</i>	99
B. <i>Le transfert caecal est-il bien toléré par les souris receveuses ?</i>	101
C. <i>Analyses du métabolisme glucidique des souris receveuses</i>	103
D. <i>Analyses générales du profil hépatique des souris receveuses</i>	107
II- EVALUATION DE L'INTEGRITE DE LA BARRIERE INTESTINALE CHEZ LES SOURIS RECEVEUSES	108
III- ANALYSES TAXONOMIQUES ET FONCTIONNELLES DU MICROBIOTE INTESTINAL DES SOURIS RECEVEUSES	111
A. <i>Comparaison du microbiote fécal avant et après le transfert pour chaque groupe de souris receveuses</i>	111
B. <i>Comparaison du microbiote fécal entre les 3 groupes de souris</i>	119
IV- IMPACT DU TRANSFERT DU MICROBIOTE OM(HFD) ET OM(OB) SUR LE METABOLISME DES SOURIS RECEVEUSES NOURRIES AVEC UN REGIME HYPERLIPIDIQUE	124
V- IMPACT DU TRANSFERT DE MICROBIOTE OM(HFD) ET OM(OB) SUR LE TISSU ADIPEUX VISCERAL DES SOURIS RECEVEUSES NOURRIES AVEC UN REGIME HYPERLIPIDIQUE	129
VI- IMPACT DU TRANSFERT DE MICROBIOTE OM(HFD) ET OM(OB) SUR L'INFLAMMATION ET LA PERMEABILITE ILEALE DES SOURIS RECEVEUSES NOURRIES AVEC UN REGIME HYPERLIPIDIQUE	131
VII- ANALYSES TAXONOMIQUES ET FONCTIONNELLES DU MICROBIOTE DES SOURIS RECEVEUSES OM(OB) ET OM(HFD)	133
VIII- LES MODIFICATIONS DU MICROBIOTE INTESTINAL OBSERVEES CHEZ LE GROUPE CONV + OM(HFD) LORS DU PROTOCOLE #1 SONT-ELLES COMPARABLES A CELLES OBSERVEES LORS DU PROTOCOLE #2 ?	146
IX- QUELS SONT LES POINTS COMMUNS ENTRE LE MICROBIOTE DES SOURIS CONV + OM(HFD) ET CONV + OM(OB) APRES 6 SEMAINES DE REGIME HYPERLIPIDIQUE ?	148
X- IMPACT DU TRANSFERT DU MICROBIOTE FECAL OM(HFD) CHEZ DES SOURIS CONVENTIONNELLES OBESES ET DIABETIQUES. ..	150
XI- IMPACT DU TRANSFERT D'UN MICROBIOTE DE SOURIS OBESES/DIABETIQUES CHEZ DES SOURIS INVALIDEES POUR LE GENE NOD 2.	152
DISCUSSION	155
I- LE CHOIX DU PROTOCOLE DE TRANSFERT CAECAL	155
II- EFFET DU TRANSFERT DE MICROBIOTE SUR LE MICROBIOTE DES SOURIS RECEVEUSES	156
A. <i>Le microbiote des souris receveuses présente des différences avant le transfert caecal</i>	156
B. <i>Comment évaluer l'impact du transfert de microbiote sur le microbiote des souris receveuses ?</i>	157
C. <i>Analyses des modifications du microbiote des souris receveuses</i>	159
III- LE TRANSFERT DU « MICROBIOTE OBESE » N'INDUIT PAS DE DESORDRES METABOLIQUES CHEZ DES SOURIS RECEVEUSES CONVENTIONNELLES.	160
IV- IMPACT DU TRANSFERT DU « MICROBIOTE INTESTINAL OBESE » SUR LE METABOLISME DES SOURIS RECEVEUSES	162
A. <i>Le transfert caecal a modifié le phénotype hépatique des souris receveuses</i>	162

<i>B. Impact différentiel du transfert du microbiote obèse OM(ob) et OM(HFD) dans des souris receveuses conventionnelles.....</i>	<i>163</i>
<i>C. Par quels mécanismes le transfert de microbiote pourrait-il modifier la néoglucogenèse hépatique ?</i>	<i>163</i>
V- CONCLUSION GENERALE	165
TRAVAUX PERSONNELS	167
ANNEXES.....	169
RÉFÉRENCES	171

Table des illustrations

FIGURE 1: REPARTITION CEPHALO-CAUDALE DES BACTERIES INTESTINALES AU SEIN DU TUBE DIGESTIF.....	20
FIGURE 2: ANALYSE DU METAGENOME PAR SEQUENÇAGE.....	22
FIGURE 3: PRINCIPALES METHODES D'ANALYSES DU MICROBIOTE INTESTINAL.	23
FIGURE 4: PRINCIPAUX FACTEURS INFLUENÇANT LA COLONISATION PHYSIOLOGIQUE DE L'INTESTIN PAR LE MICROBIOTE INTESTINAL.....	25
FIGURE 5: ORGANISATION SCHEMATIQUE DE LA BARRIERE INTESTINALE.	33
FIGURE 6: STRUCTURE D'UNE JONCTION SERREE.	35
FIGURE 7: ORGANISATION SIMPLIFIEE DE L'IMMUNITE INTESTINALE EN CONDITION PHYSIOLOGIQUE.	37
FIGURE 8: ORGANISATION ANATOMIQUE DU DRAINAGE SANGUIN ET LYMPHATIQUE DE L'INTESTIN.....	40
FIGURE 9: LES ORGANES IMPLIQUES DANS LA REGULATION DE LA GLYCEMIE.....	44
FIGURE 10: LES QUATRE DEVENIRS POSSIBLES DU GLUCOSE INTRACELLULAIRE.	49
FIGURE 11: SCHEMA DETAILLE DES REACTIONS IMPLIQUEES DANS LA GLYCOLYSE.....	51
FIGURE 12: VOIE DE SYNTHESE ET D'UTILISATION DU GLYCOGENE HEPATIQUE.	52
FIGURE 13: LA NEOGLUCOGENESE HEPATIQUE.	55
FIGURE 14: ORIGINE DES PRECURSEURS NEOGLUCOGENIQUES.	56
FIGURE 15: REGULATION DE LA NEOGLUCOGENESE HEPATIQUE PAR L'INSULINE.....	59
FIGURE 16 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA BALANCE GLYCEMIQUE LORS DU DIABETE DE TYPE 2...	62
FIGURE 17: REPRESENTATION SIMPLIFIEE DE LA PROGRESSION DE L'INSULINORESISTANCE LORS DE DEVELOPPEMENT DU DIABETE DE TYPE 2.	63
FIGURE 18: COLONISATION DES SOURIS AXENIQUES AVEC LE MICROBIOTE DE SOURIS MINCES OU OBESES. 67	
FIGURE 19: LES PRINCIPALES SOURCES ENERGETIQUES DE L'HOTE ET DE SES BACTERIES INTESTINALES.	71
FIGURE 20: REGULATION DE LA PRODUCTION HEPATIQUE DE GLUCOSE PAR LES ACIDES GRAS A CHAINE COURTE.....	73
FIGURE 21: L'ORIGINE INTESTINALE DE L'INFLAMMATION DE BAS GRADE CARACTERISTIQUE DES MALADIES METABOLIQUES.	77
FIGURE 22: LA PROCEDURE DE TRANSPLANTATION FECALE.....	82
FIGURE 23: SCHEMA DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL #1.....	98
FIGURE 24: ANALYSES DU TRANSPLANT DU PREMIER PROTOCOLE #1.	100
FIGURE 25: NUMERATION DES LEUCOCYTES DANS LE SANG DES SOURIS RECEVEUSES.....	102
FIGURE 26: IMPACT DU TRANSFERT DE MICROBIOTE SUR LE METABOLISME HEPATIQUE DES SOURIS RECEVEUSES.	104
FIGURE 27: ANALYSES METABOLOMIQUES DU PLASMA DES SOURIS RECEVEUSES.....	105
FIGURE 28: ANALYSES DU TRANSCRIPTOME HEPATIQUE DES SOURIS RECEVEUSES.	106
FIGURE 29: ANALYSES COMPLEMENTAIRES EFFECTUEES SUR LE FOIE DES SOURIS RECEVEUSES.....	107

FIGURE 30: ANALYSES DE LA BARRIERE INTESTINALE DES SOURIS RECEVEUSES.	109
FIGURE 31: ANALYSES HISTOLOGIQUES DE L'ILEON DES SOURIS RECEVEUSES EN COLORATION BLEU ALCIAN.	110
FIGURE 32: ANALYSES HISTOLOGIQUES DE L'ILEON DES SOURIS RECEVEUSES EN COLORATION HEMATOXYLINE/EOSINE (HE).	111
FIGURE 33: ANALYSE DES MODIFICATIONS DU MICROBIOTE FECAL PRELEVE AVANT ET APRES LE TRANSFERT DE MICROBIOTE POUR LES TROIS GROUPES DE SOURIS CONV + PBS, CONV + LM ET CONV +OM(HFD) LORS DU PROTOCOLE #1.	113
FIGURE 34: GROUPES BACTERIENS SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTS ENTRE LE MICROBIOTE DES SOURIS CONV + PBS EN CONDITION BASALE ET TRANS NC LORS DU PROTOCOLE #1.	114
FIGURE 35: GROUPES BACTERIENS SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTS ENTRE LE MICROBIOTE DES SOURIS CONV + LM EN CONDITION BASALE ET TRANS NC LORS DU PROTOCOLE #1.	115
FIGURE 36: GROUPES BACTERIENS SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTS ENTRE LE MICROBIOTE DES SOURIS CONV + OM(HFD) EN CONDITION BASALE ET TRANS NC LORS DU PROTOCOLE #1.	116
FIGURE 37 (A ET B): ANALYSES PREDICTIVES DES FONCTIONS MICROBIENNES SIGNIFICATIVEMENT MODIFIEES AVANT ET APRES LE TRANSFERT DE MICROBIOTE CHEZ LES SOURIS CONV +PBS ET CONV + LM LORS DU PROTOCOLE #1.	117
FIGURE 37 (C): ANALYSES PREDICTIVES DES FONCTIONS MICROBIENNES SIGNIFICATIVEMENT MODIFIEES ENTRE AVANT ET APRES LE TRANSFERT DE MICROBIOTE CHEZ LE GROUPE CONV +OM(HFD) LORS DU PROTOCOLE #1.	118
FIGURE 38: ANALYSE DES DIFFERENCES PRESENTES AVANT LE TRANSFERT DE MICROBIOTE (CONDITION BASALE) ENTRE LE MICROBIOTE DES 3 GROUPES DE SOURIS CONV + PBS, CONV + LM ET CONV + OM(HFD) LORS DU PROTOCOLE #1.....	120
FIGURE 39: ANALYSE DES DIFFERENCES PRESENTES APRES LE TRANSFERT DE MICROBIOTE (CONDITION TRANS NC) ENTRE LE MICROBIOTE DES 3 GROUPES DE SOURIS CONV + PBS, CONV + LM ET CONV + OM(HFD) LORS DU PROTOCOLE #1.....	121
FIGURE 40: ANALYSES PREDICTIVES DES FONCTIONS MICROBIENNES SIGNIFICATIVEMENT MODIFIEES ENTRE LES 3 GROUPES DE SOURIS CONV + PBS, CONV + LM ET CONV + OM(HFD) EN CONDITION BASALE LORS DU PROTOCOLE #1.	122
FIGURE 41: ANALYSES PREDICTIVES DES FONCTIONS MICROBIENNES SIGNIFICATIVEMENT MODIFIEES ENTRE LES 3 GROUPES DE SOURIS CONV + PBS, CONV + LM ET CONV + OM(HFD) APRES LE TRANSFERT DE MICROBIOTE LORS DU PROTOCOLE #1.	123
FIGURE 42: SCHEMA DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL #2.....	125
FIGURE 43: MESURE DE LA TOLERANCE AU PYRUVATE CHEZ LES SOURIS RECEVEUSES CONV + OM(HFD) ET CONV + OM(OB) NOURRIES AVEC UN REGIME NORMAL.	126
FIGURE 44: ANALYSES DU METABOLISME HEPATIQUE DES SOURIS RECEVEUSES CONV + OM(HFD) ET CONV + OM(OB) APRES 6 SEMAINES DE REGIME HYPERLIPIDIQUE.....	128
FIGURE 45: ANALYSES DU PROFIL HEPATIQUE DES SOURIS RECEVEUSES NOURRIES AVEC UN REGIME HYPERLIPIDIQUE.....	129
FIGURE 46: ANALYSES DU TISSU ADIPEUX ET BILAN LIPIDIQUE DES SOURIS RECEVEUSES NOURRIES AVEC UN REGIME HYPERLIPIDIQUE.	130

FIGURE 47: INFLAMMATION ET PERMEABILITE ILEALE CHEZ LES SOURIS RECEVEUSES CONV + OM(HFD) ET CONV + OM(OB) NOURRIES AVEC UN REGIME HYPERLIPIDIQUE.....	132
FIGURE 48: ANALYSES DES MODIFICATIONS DU MICROBIOTE FECAL PRELEVE AVANT ET APRES LE TRANSFERT DE MICROBIOTE POUR LES 3 GROUPES DE SOURIS CONV + PBS, CONV + OM(OB) ET CONV + OM(HFD) LORS DU PROTOCOLE #2.	134
FIGURE 49: COMPARAISON DU MICROBIOTE DES SOURIS CONV + PBS EN CONDITION BASALE ET TRANS NC LORS DU PROTOCOLE #2.....	135
FIGURE 50: COMPARAISON DU MICROBIOTE DES SOURIS CONV + OM(OB) EN CONDITION BASALE ET TRANS NC LORS DU PROTOCOLE #2.	136
FIGURE: 51: COMPARAISON DU MICROBIOTE DES SOURIS CONV + OM(HFD) EN CONDITION BASALE ET TRANS NC LORS DU PROTOCOLE #2.	137
FIGURE 52 (A ET B): ANALYSES PREDICTIVES DES FONCTIONS MICROBIENNES SIGNIFICATIVEMENT MODIFIEES ENTRE AVANT ET APRES LE TRANSFERT DE MICROBIOTE CHEZ LES GROUPES DE SOURIS CONV + PBS ET CONV + OM(OB) LORS DU PROTOCOLE #2.	138
FIGURE 52 (C): ANALYSES PREDICTIVES DES FONCTIONS MICROBIENNES SIGNIFICATIVEMENT MODIFIEES ENTRE AVANT ET APRES LE TRANSFERT DE MICROBIOTE CHEZ LE GROUPE CONV + OM(HFD) LORS DU PROTOCOLE #2.	139
FIGURE 53: ANALYSE DES DIFFERENCES PRESENTES AVANT LE TRANSFERT DE MICROBIOTE (CONDITION BASALE) ENTRE LE MICROBIOTE DES 3 GROUPES DE SOURIS CONV + PBS, CONV + OM(OB) ET CONV + OM(HFD) LORS DU PROTOCOLE #2.	140
FIGURE 54: ANALYSE DES DIFFERENCES PRESENTES APRES LE TRANSFERT DE MICROBIOTE (CONDITION TRANS NC) ENTRE LE MICROBIOTE DES 3 GROUPES DE SOURIS CONV + PBS, CONV + OM(OB) ET CONV + OM(HFD) LORS DU PROTOCOLE #2.	141
FIGURE 55: ANALYSE DES DIFFERENCES PRESENTES APRES LE REGIME HYPERLIPIDIQUE (CONDITION TRANS 72%HFD) ENTRE LE MICROBIOTE DES 3 GROUPES DE SOURIS CONV + PBS, CONV + OM(OB) ET CONV + OM(HFD) LORS DU PROTOCOLE #2.	142
FIGURE 56: ANALYSES PREDICTIVES DES FONCTIONS MICROBIENNES SIGNIFICATIVEMENT MODIFIEES ENTRE LES TROIS GROUPES DE SOURIS CONV +PBS, CONV + OM(OB) ET CONV + OM(HFD) AVANT ET APRES LE TRANSFERT DE MICROBIOTE LORS DU PROTOCOLE #2.	144
FIGURE 57: ANALYSES PREDICTIVES DES FONCTIONS MICROBIENNES SIGNIFICATIVEMENT MODIFIEES ENTRE LES 3 GROUPES DE SOURIS CONV + PBS, CONV + OM(OB) ET CONV + OM(HFD) APRES 6 SEMAINES DE REGIME HYPERLIPIDIQUE (TRANS 72%HFD) LORS DU PROTOCOLE #2.....	145
FIGURE 58: MISE EN COMMUN DES DONNEES DE PYROSEQUENÇAGE OBTENUES LORS DE PROTOCOLE #1 ET #2 POUR LES GROUPES DE SOURIS CONV + OM(HFD).....	147
FIGURE 59: IMPACT DU TRAITEMENT AVEC <i>BACTEROIDES VULGATUS</i> SUR LE METABOLISME GLUCIDIQUE.	149
FIGURE 60: PROTOCOLE EXPERIMENTAL DU TRANSFERT DE MICROBIOTE FECAL.....	150
FIGURE 61: LE TRANSFERT D'UN MICROBIOTE OBESE INDUIT UNE BAISSSE DE LA GLYCEMIE LORS D'UN TEST DE TOLERANCE AU PYRUVATE CHEZ DES SOURIS OBESES/DIABETIQUES.....	151
FIGURE 62: IMPACT DU TRANSFERT DE MICROBIOTE SUR LA TOLERANCE AU PYRUVATE DES SOURIS INVALIDEES POUR LE GENE NOD 2.	152
FIGURE 63: EFFET D'UN TRAITEMENT AU MURAMYL DIPEPTIDE (MDP) SUR LA TOLERANCE AU PYRUVATE.	153

Liste des abréviations

ADN: Acide DésoxyriboNucléique	GALT: Gut-Associated Lymphoid Tissue
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire	GIP: Gastric Inhibitory Polypeptide ou glucose-dependent insulintropic peptide
AGL: Acide Gras Libre	GLP-1: Glucagon Like Peptide-1
ALT: ALanine aminoTransférase	GLUT: GLucose Tranporter
AMPC: Adénosine MonoPhosphate cyclique	GPR41/GPR43: G-Protein-coupled Receptor 41 et 43
AST: ASpartate aminoTranférase	GTP: Guanosine TriPhosphate
ADP: Adénosine DiPhosphate	HDL: High Density Lipoprotein
AGCC: Acide Gras à Chaîne Courte	HFD: High Fat Diet
Akt: souche de souris Ak et t pour thymome (aussi appelée PKB pour Protéine Kinase B)	IFN-γ: InterFéroN gamma
AMPC: Adénosine MonoPhosphate cyclique	IgA: Immunoglobuline A
AMPK: Adénosine MonoPhosphate Kinase (Kinase activée par l'AMP)	IL- : InterLeukine-
ANGPTL4: ANGioPoieTin-Like protein 4	iNOS: inductible Nitric Oxyde Synthase
ATP: Adénosine TriPhosphate	JAM-A: Junctional Adhesion Molecule-A
BCR: B Cell Receptor	KO: Knock Out
Bv: <i>Bacteroides vulgatus</i>	LDL: Low Density Lipoprotein
CCK: CholeCystoKinine	LKB-1: Liver Kinase B-1
C. difficile: <i>Clostridium difficile</i>	LM: Lean Microbiota
CD: Cluster de Différenciation	LPL: LipoProtéine Lipase
CFU: Colony-Forming Unit	LPS: LipoPolySaccharide
CPA: Cellule Présentatrice d'Antigène	MCA: MuriCholic Acid
FFAR2/FFAR3: Free Fatty Acid Receptor 2 ou 3	MDP: MuramylDiPeptide
FGF 15: Fibroblast Growth Factor 15	MetaHIT: Metagenomics of the Human Intestinal Tract
FITC: IsoThioCyanate de Fluorescéine	MyD88: Myeloid Differentiation primary response gene 88
FoxO1: Forkhead box protein O1	NADH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide + H ⁺
FXR: Farnesoid X Receptor	NADPH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate + H ⁺
G6Pase: Glucose-6-Phosphatase	

NCBI: National Center of Biotechnology Information

NF- κ B: Nuclear Factor- κ B

NOD like receptor: Nucleotide Oligomerization Domain like receptor

NOD 2: Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2

OM: Obese Microbiota

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCA: Principal Component Analysis

PCoA: Principal Coordinate Analysis

PCR: Réaction en Chaîne par Polymérase

PEPCK: PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase

PFA: ParaFormAldéhyde

PICRUSt: Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States

PKA: Protéine Kinase A

PYY: Peptide tYrosine tYrosine

RAG1 ou **RAG2:** Recombination-Activating Gene 1 ou 2

REG-3 γ et -3 β : REGenerating islet-derived protein -3 γ et -3 β

RPL19: Protéine Ribosomale L19

SFB: Bactéries Segmentées Filamenteuses

SGLT1: Sodium-Glucose Linked Transporteur 1

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3

T- β MCA: Tauro- β MuriCholic Acid

TCR: T Cell Receptor

TGF- β : Transforming Growth Factor- β

Th: Lymphocyte T helper

TLR: Toll Like Receptor

TMAO: TriMéthylAmine-N-Oxyde

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α

ZO-1 : Zonula Occludens-1

Avant propos

Il y a encore cinq ans je voyais, à tort, l'intestin comme un simple organe absorbant, un sac de tripes inertes. Ce point de vue étiologique a vite été battu en brèche par la quantité de littérature scientifique vantant les prouesses de cet organe. J'ai appris qu'il était capable de bouger de façon autonome, de sécréter des hormones et même de communiquer avec le cerveau ! Mais ce n'est pas tout, cet organe est également le lieu d'habitation d'environ cent mille milliards de microorganismes. Lors de ma thèse, j'ai pu apprécier le rôle fondamental que jouent ces microorganismes sur la physiopathologie de l'hôte. En effet, certaines bactéries sont impliquées dans de nombreuses maladies inflammatoires, auto-immunes ou métaboliques. A l'inverse, d'autres espèces sont dotées de propriétés anti-inflammatoires ou encore capables de produire des métabolites absorbables par l'intestin et bénéfiques pour l'hôte. Dès lors, les bactéries du microbiote intestinal peuvent être considérées à la fois comme une cible thérapeutique potentielle ou comme un médicament prometteur. D'ailleurs certains chiffres laissent songeurs. Imaginez, nous sommes environ 7 milliards d'êtres humains sur terre et nous éliminons en moyenne 150 g de selles par jour. Sachant qu'environ 10% de la matière fécale humaine est constituée de bactéries intestinales, on peut en conclure que tous les jours pas moins de 15 millions de kilogrammes de bactéries intestinales sont déféquées par l'Homme. Si certaines de ces bactéries recèlent des propriétés thérapeutiques, les quantités produites par jour et le très faible coût de production en font de loin le médicament le plus rentable de tous les temps!

L'équipe d'accueil dans laquelle j'ai effectué cette thèse s'intéresse à l'implication du microbiote intestinal et de ses altérations dans le développement des maladies métaboliques. Et nous ne sommes pas les seuls, plusieurs autres équipes à travers le monde travaillent sur cette thématique. Pourquoi cet engouement ? D'abord parce qu'il a été constaté que les microorganismes présents dans l'intestin d'un individu sain sont différents de ceux présents chez un individu obèse et/ou diabétique. Une question simple a découlé de ce constat : est-ce que ces modifications du microbiote sont impliquées dans le développement de la maladie ? La réponse à cette question est encore incomplète mais il semblerait que cela soit le cas. Dès lors, le rétablissement d'un microbiote fonctionnel chez les personnes malades est devenu une piste crédible pour le traitement des maladies métaboliques.

Introduction bibliographique

I- Le microbiote intestinal

A. Généralités

Les bactéries sont partout : du fin fond des océans, au sommet de l'Everest en passant par les cratères des volcans. Ces organismes procaryotes sont présents sur terre depuis plus de 3 milliards d'années¹ et pourtant l'Homme a appris leur existence il y a à peine 350 ans. Nous devons cette découverte à Antoni van Leeuwenhoek qui a observé pour la première fois des bactéries à l'aide du microscope qu'il avait inventé. L'apparition des organismes eucaryotes pluricellulaires sur terre a donc eu lieu dans un environnement déjà largement peuplé par des bactéries. Dans ces conditions, il est impensable d'imaginer que nous soyons stériles et que des bactéries ne profitent pas des conditions de vie exceptionnelles de notre intestin, comme la température constante (37°C) ou la nourriture abondante, pour se développer. En effet, nous sommes habités par plus de 1000 espèces bactériennes différentes qui représentent entre 1 et 3 kilogrammes de notre masse corporelle². Ces bactéries ne sont pas les seuls habitants du tractus digestif et celui-ci est également colonisé par des champignons, des levures, des archées et des virus. **L'ensemble de ces microorganismes est connu sous le nom de microbiote intestinal.**

Le microbiote intestinal humain est principalement composé de bactéries anaérobies (*i.e.* qui peuvent vivre en d'absence d'oxygène). A l'heure actuelle, plus d'un millier d'espèces ont été identifiées et ces espèces sont regroupées dans seulement quelques phyla. Les phyla correspondent au deuxième rang de la classification des êtres vivants juste sous le règne (qui comprend les groupes des animaux, des végétaux, des champignons, des protistes, des bactéries et des archées). Quatre-vingt-dix pourcents des espèces bactériennes issues du microbiote appartiennent aux phyla des Firmicutes, des Bactéroidetes et des Actinobactéries. D'autres phyla minoritaires sont également retrouvés comme les Protéobactéries, les Fusobactéries ou les Verrucomicrobia^{3,4}. Détailler toutes les espèces bactériennes qui composent ces phyla est impossible. Néanmoins, il semble intéressant de donner quelques précisions sur les genres bactériens qui se cachent derrière les phyla majeurs.

Le phylum des Firmicutes inclut les genres *Ruminococcus*, *Clostridium* et *Lactobacillus* (dont plusieurs souches sont utilisées comme probiotiques (**cf Introduction III-C-1**)) et pour la fermentation des yaourts) ainsi que des bactéries productrices de butyrate comme les Eubactéries. Le phylum des Bactéroidetes est, quant à lui, composé entre autres des genres *Bacteroides*, les *Prevotella* et les *Xylanibacter* impliqués dans la dégradation des glucides complexes. Enfin, le phylum des Actinobactéries comprend le genre *Bifidobacterium* dont certaines espèces sont également utilisées comme probiotiques (**cf Introduction III-C-1**)).

La répartition des bactéries le long du tube digestif n'est pas homogène. En effet, l'estomac est un milieu très pauvre en bactéries (environ 100 bactéries par gramme de contenu stomacal) car son pH acide et la présence d'enzymes digestives ne sont pas favorables à la croissance bactérienne. Ensuite, la concentration en bactéries augmente le long du tractus

digestif pour être maximale dans le côlon (environ 1000 milliards de bactéries par gramme de contenu intestinal) (**Figure 1**). Plusieurs phénomènes peuvent expliquer cette répartition en gradient. Dans un premier temps, la vitesse de transit dans l'intestin grêle étant supérieure à celle du côlon, on peut supposer que les bactéries sont mécaniquement chassées des parties hautes de l'intestin pour mieux s'implanter dans le côlon où le transit est beaucoup plus lent. Par ailleurs, il est également important de tenir compte de la présence des acides biliaries dans la partie haute de l'intestin grêle. Les acides biliaries sont des molécules amphiphiles formées par le foie et déversées dans le duodénum en réponse à un repas. Ils permettent la solubilisation des graisses alimentaires ce qui facilite alors la digestion et l'absorption des lipides par l'intestin. Les acides biliaries agissent également comme un puissant antiseptique empêchant donc la colonisation massive des parties hautes du tractus digestif par des bactéries⁵. Les acides biliaries sont majoritairement réabsorbés dans l'iléon et seulement une petite proportion se retrouve au contact du microbiote du côlon⁶. Le microbiote colique subit donc peu les effets antiseptiques des acides biliaries.

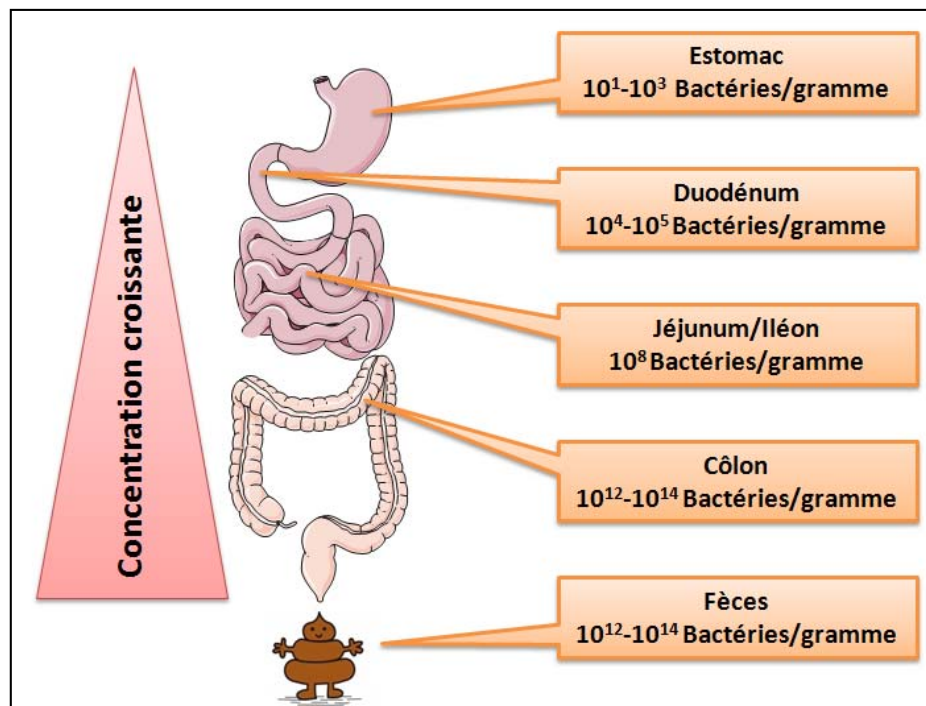


Figure 1: Répartition céphalo-caudale des bactéries intestinales au sein du tube digestif.

La concentration des bactéries dans le tube digestif augmente progressivement de l'estomac au côlon. Elle passe de 10^1 - 10^3 bactéries par gramme de contenu intestinal dans l'estomac à 10^{12} - 10^{14} bactéries par gramme de contenu intestinal dans le côlon. La quantité retrouvée dans le côlon est similaire à celle présente dans les fèces.

D'autre part, il est important de préciser que la plupart des bactéries sont situées dans la lumière intestinale et que seulement une minorité (moins diverse et plus spécifique) des bactéries sont en contact avec la muqueuse. Plusieurs facteurs conditionnent cette répartition comme la capacité des bactéries à adhérer au mucus intestinal⁷.

En pratique, il est difficile de récupérer les bactéries intestinales directement dans le côlon car cette procédure est invasive pour le patient et nécessite une anesthésie. Par conséquent, l'étude des selles, beaucoup plus faciles d'accès, est devenue une pratique courante pour caractériser le microbiote intestinal. L'analyse des bactéries présentes dans les selles donne un aperçu des bactéries retrouvées dans la lumière du côlon, mais pour analyser plus précisément le microbiote présent au contact du mucus des biopsies sont nécessaires⁸.

L'analyse complète des bactéries présentes dans notre intestin s'est heurtée pendant de nombreuses années à des problèmes techniques majeurs⁹. L'étude et l'identification des bactéries ont longtemps reposé sur des critères morphologiques (taille et forme de la bactérie, mobilité, présence de spores...) et biochimiques (utilisation préférentiel d'un substrat plutôt qu'un autre, développement en milieu sans oxygène...). Pour cela, la mise en culture et l'isolation des espèces bactériennes à caractériser sont nécessaires. Malheureusement, seulement une minorité (environ 10%) des bactéries du microbiote intestinal peut être cultivée et isolée *in vitro*⁹. Il aura donc fallu attendre la mise au point des techniques de séquençage à haut débit (apparues dans les années 2000) pour réellement dynamiser la recherche sur le microbiote intestinal et en identifier les espèces. A l'heure actuelle, le séquençage de l'ADN bactérien 16S est la méthode la plus utilisée pour identifier les espèces microbiennes intestinales (**Figure 2**). Les bactéries contiennent des ribosomes de 70S composés de deux sous unités de 30S et 50S. La sous unité de 30S contient une molécule d'ADN 16S. C'est cet ADN 16S qui permet l'identification des espèces bactériennes. L'ADN 16S est présent dans tous les ribosomes des bactéries mais il contient des domaines très variables spécifiques des différentes espèces bactériennes. En séquençant les régions variables de l'ADN 16S il est donc possible de retrouver à quelle bactérie il appartient. Les régions variables de l'ADN 16S bactérien sont amplifiées par PCR puis séquencées. Ensuite, les séquences obtenues sont comparées à des bases de données pour identifier les espèces bactériennes correspondantes à ces séquences. Ainsi, le séquençage des régions variables de l'ADN 16S est devenu la méthode référence pour caractériser le microbiote intestinal. Ce type d'analyse renseigne sur le nom des espèces présentes dans l'intestin mais pas sur leurs fonctions.

Pour retrouver les fonctions exercées par ces bactéries plusieurs méthodes sont possibles. La plus robuste et la plus fine consiste à séquencer les génomes entiers de toutes les bactéries intestinales et pas seulement l'ADN 16S (**Figure 2**). Cette technique renseigne directement sur les gènes présents dans le microbiote intestinal analysé. Ce type d'approche a permis d'identifier presque 10 millions de gènes bactériens différents dans le microbiote humain et autour de 3 millions de gènes dans le microbiote murin^{10,11}. Une autre méthode consiste à prédire les fonctions des bactéries présentes dans l'intestin à partir de leurs noms obtenus par l'analyse de l'ADN 16S. Cette méthode bioinformatique a été développée par une équipe américaine et se nomme PICRUSt pour: Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States¹². Cette approche a permis de mettre en évidence que le nom d'une bactérie était suffisamment corrélé à ses fonctions pour que l'on puisse prédire son génome à partir de son nom. Néanmoins, pour que cette méthode soit fiable il faut que le génome des bactéries identifiées ait déjà été étudié auparavant (**Figure 2**).

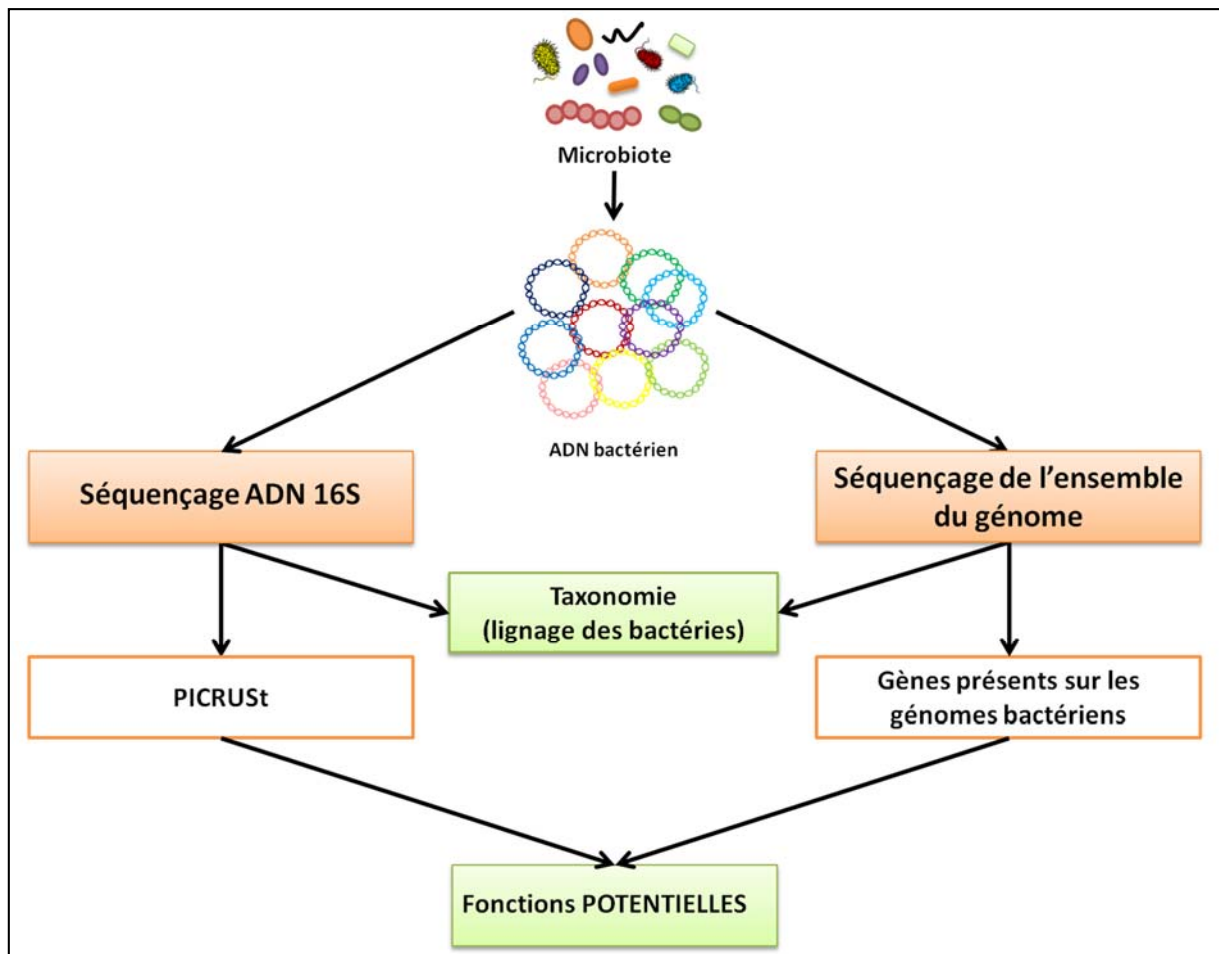


Figure 2: Analyse du métagénome par séquençage.

L'extraction et l'analyse de l'ADN bactérien sont devenues les méthodes de choix pour caractériser le microbiote intestinal. Chaque espèce bactérienne possède une séquence d'ADN 16S spécifique. Le séquençage de cette ADN 16S permet l'identification des bactéries présentes dans l'échantillon. Ensuite, l'analyse PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) permet de prédire les gènes présents dans le génome des bactéries identifiées seulement à partir du séquençage de leur ADN 16S. Il est donc possible d'avoir un aperçu des fonctions potentiellement exercées par le microbiote intestinal en séquençant uniquement l'ADN 16S. Le séquençage de l'ensemble du génome permet l'identification plus précise des espèces bactériennes présentes dans l'échantillon. De plus, cette analyse donne accès aux gènes codés par les bactéries et permet de prédire les fonctions exercées sans avoir recours à des prédictions informatiques comme le PICRUSt. Cependant, quelle que soit la méthode utilisée, le séquençage de l'ADN ne rend pas compte des fonctions actives dans l'échantillon mais seulement des fonctions que les bactéries peuvent exercer.

Les analyses de l'ADN bactérien ne permettent pas de déterminer si l'ADN provient de bactéries mortes ou si les gènes séquencés et identifiés sont actifs et transcrits par les bactéries intestinales. Le séquençage de l'ADN bactérien nous révèle uniquement les fonctions potentielles exercées par le microbiote mais pas les fonctions réellement actives. Pour contourner cette limitation, il est possible d'analyser le métatranscriptome qui correspond à l'ensemble des ARN d'origine procaryotes présents dans l'échantillon et qui est donc le reflet des gènes actifs et transcrits au moment du prélèvement¹³. Par ailleurs, l'analyse des métabolites produits par le microbiote (métabolomique) peut également renseigner sur les fonctions exercées par les bactéries (**Figure 3**).

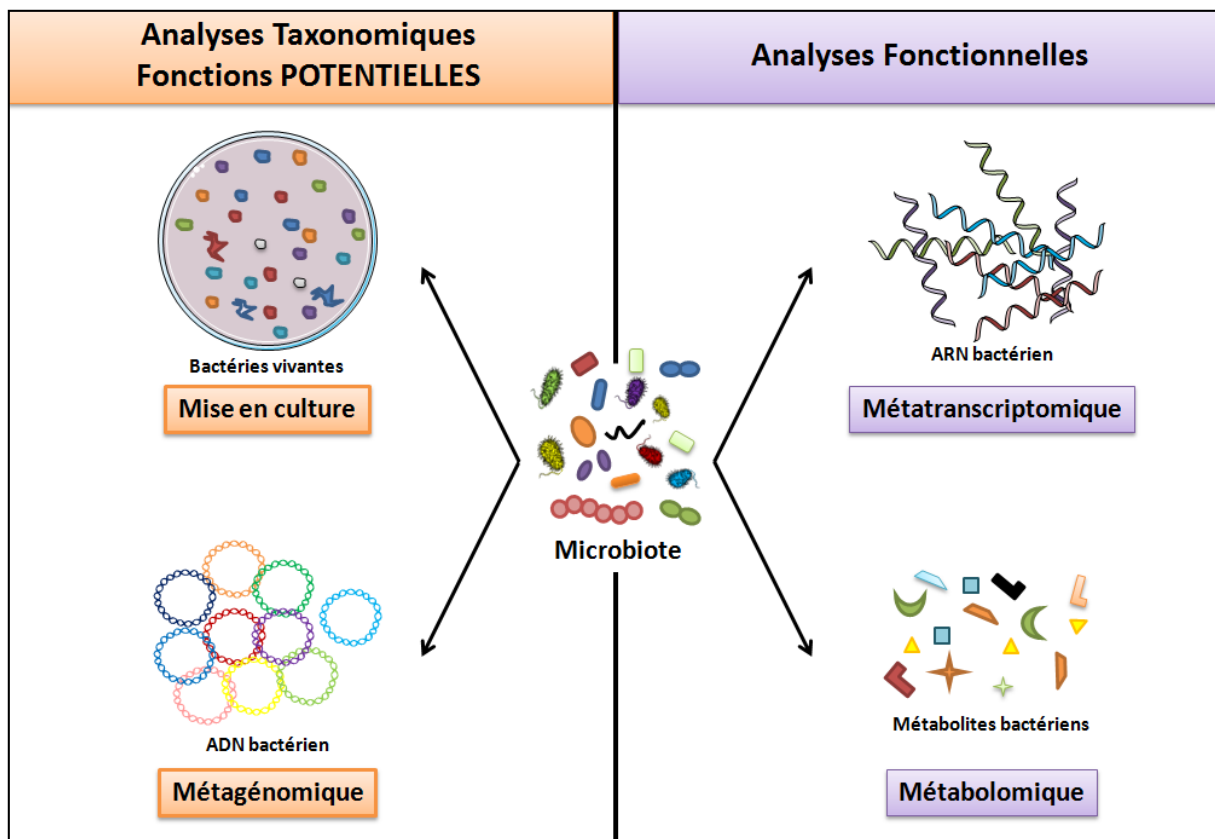


Figure 3: Principales méthodes d’analyses du microbiote intestinal.

La mise en culture des selles a été pendant longtemps la seule méthode d’analyse disponible pour caractériser le microbiote intestinal. Cette méthode permet l’identification des espèces cultivées et l’évaluation *in vitro* des fonctions exercées par les bactéries intestinales. Néanmoins, cette méthode est limitée car presque 70% des bactéries intestinales ne sont pas cultivables. La métagénomique consiste en l’étude du génome bactérien et fournit une vision globale des populations microbiennes présentes au sein d’un échantillon. La métatranscriptomique s’intéresse aux transcrits bactériens et permet l’identification des activités métaboliques exprimées par l’ensemble des microorganismes présents dans l’échantillon. Enfin, la métabolomique consiste en l’étude de l’ensemble des métabolites (sucres, acides aminés, acides gras...) présents dans l’échantillon et rend compte des voies métaboliques procaryotes actives.

Il est important de préciser que l’analyse du microbiote, aussi fine soit elle, se fait souvent sur un échantillon unique prélevé à un temps t. Cette analyse ne rend absolument pas compte de la nature extrêmement dynamique du microbiote et il est impossible de déterminer si les bactéries identifiées prolifèrent, sont quiescentes ou sont vivantes. La nature dynamique du microbiote ne peut s’évaluer qu’en faisant plusieurs prélèvements au cours du temps. Néanmoins, l’abondance des espèces bactériennes retrouvées dans un échantillon est relative (elle est exprimée en pourcentage d’abondance par rapport à l’ensemble des bactéries identifiées lors de l’analyse). Par exemple, admettons que chez un même individu une espèce bactérienne passe de 1% à 10% d’abondance relative suite à un traitement quelconque. Est-il possible affirmer que le nombre de bactéries appartenant à cette espèce a augmenté suite au traitement ? La réponse est extrêmement difficile car on ne sait pas si l’augmentation de la proportion relative de la bactérie est due à sa prolifération ou simplement parce que d’autres bactéries sont mortes faisant ainsi augmenter son pourcentage relatif d’abondance. Pour contourner ce problème, un laboratoire Israélien a développé une nouvelle méthode pour

déterminer quelles sont, parmi les espèces bactériennes identifiées, celles qui prolifèrent¹⁴. Je vais tenter d'expliquer simplement cette méthode puisqu'elle pourrait devenir, dans les années qui viennent, une méthode d'analyse de référence. Les auteurs de l'étude sont partis du constat que l'ADN bactérien est constitué par un seul chromosome circulaire et que chaque bactérie en possède une copie unique. Lors de la phase de croissance, la bactérie duplique son ADN et commence la réplication toujours à partir de la même origine. L'ensemble des bactéries qui prolifèrent dans un échantillon ne se divisent pas de manière synchrone et sont à un stade différent de la réplication de leur ADN. A un temps t , plusieurs molécules d'ADN issues d'une même espèce bactérienne peuvent donc avoir des tailles différentes en fonction de l'avancée de leur réplication. Les séquences proches de l'origine de réplication sont dupliquées en premier et sont donc présentes sur tous les fragments d'ADN de tailles différentes. Le rapport du nombre de séquences identifiées contenant la séquence codant pour l'origine de réplication sur le nombre de copies entières pour chaque molécule d'ADN peut donc renseigner sur l'état de prolifération d'une espèce donnée. En effet, si ce rapport est égal à 1 cela signifie que toutes les séquences d'ADN qui contiennent l'origine de réplication sont entières, la bactérie est alors quiescente. Grâce à cette méthode, **il est possible d'estimer la dynamique de modification du microbiote à partir d'un seul échantillon.**

B. Les « facteurs » qui régulent l'acquisition du microbiote intestinal

1) Comment le microbiote nous colonise-t-il ?

Le dogme actuel stipule que l'intestin est stérile à la naissance et la colonisation du tractus digestif commence dès la rupture de la membrane fœtale. Néanmoins, plusieurs études font état de la présence d'ADN bactérien dans le liquide amniotique en condition physiologique^{15,16}. Au cours de la vie intra-utérine l'intestin du fœtus est littéralement rempli de liquide amniotique. Il paraît donc légitime de penser que l'intestin du nouveau-né est déjà en contact avec de l'ADN bactérien avant la naissance. De plus, il a également été mis en évidence qu'il y avait de l'ADN bactérien dans le placenta¹⁷. Le placenta étant le lieu d'échange entre la mère et l'enfant il est donc possible que cet ADN puisse franchir le placenta et se retrouver dans la circulation fœtale. **Néanmoins, la présence d'ADN bactérien au contact du fœtus n'implique pas forcément la présence de bactéries. De surcroît, la présence de bactéries vivantes en contact avec le fœtus n'est pas clairement démontrée.**

Malgré la présence d'ADN bactérien dans le liquide amniotique, c'est à la naissance que l'intestin du nouveau-né est confronté à une multitude de microorganismes. La colonisation de l'intestin par les bactéries est avant tout un processus stochastique qui confère à chaque individu un microbiote unique. Le microbiote se façonne au gré du passage des bactéries dans notre tube digestif. Néanmoins, plusieurs facteurs ont été identifiés comme étant capables de moduler cette colonisation : le mode d'accouchement (voie basse ou césarienne), les conditions d'hygiène et la nutrition néonatale (**Figure 4**).

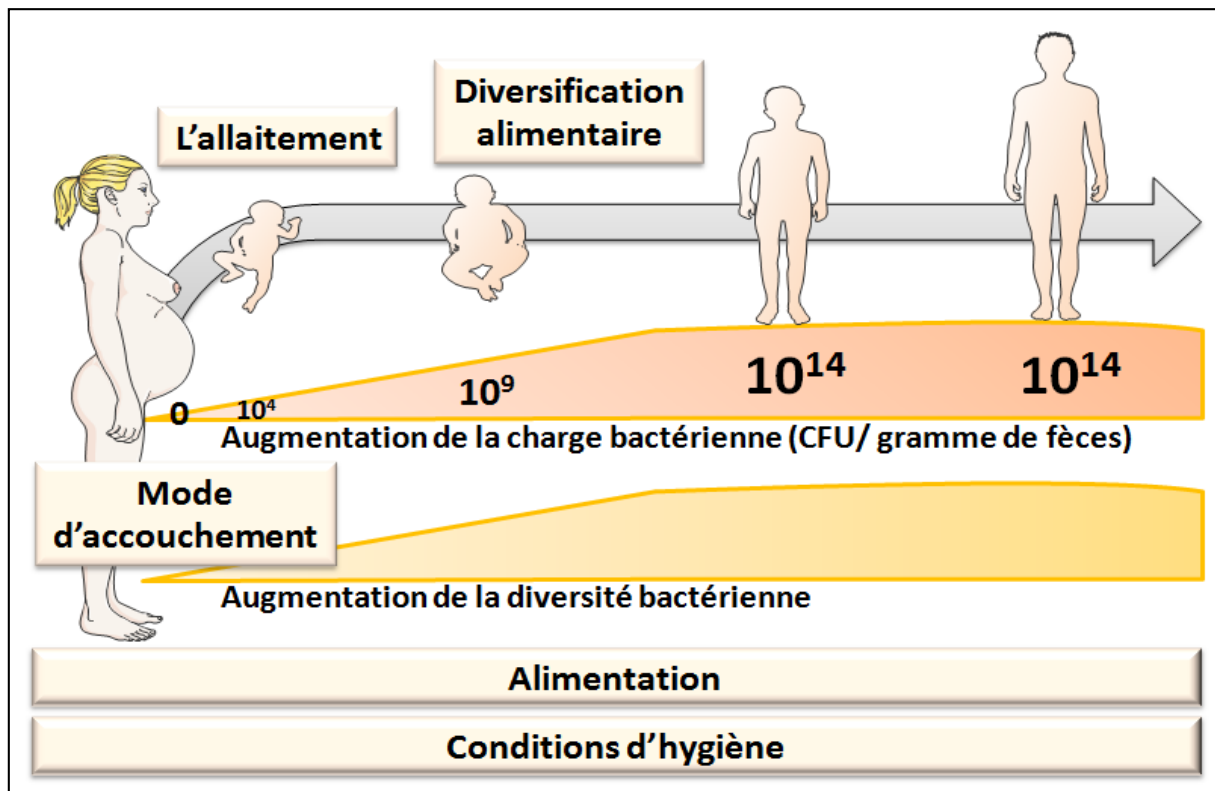


Figure 4: Principaux facteurs influençant la colonisation physiologique de l'intestin par le microbiote intestinal.

Figure créée à partir de « Young microbe for adult obesity ; Serino M *et al.*¹⁸ »

L'enfant est exposé à une grande quantité de microorganismes lors de la rupture de la paroi utérine. Le mode d'accouchement (voie basse ou césarienne) conditionne l'arrivée des premières bactéries dans le tube digestif. Par la suite, l'allaitement et plus généralement l'alimentation vont dicter l'établissement des espèces bactériennes dans le tractus digestif. Enfin les conditions d'hygiène vont également sélectionner les bactéries présentes dans l'environnement et donc les bactéries capables de s'introduire dans l'intestin. La colonisation de l'intestin est progressive, la charge et la diversité bactérienne vont augmenter au cours du temps pour se stabiliser vers l'âge de 2 ans.

2) Le mode d'accouchement

Longtemps utilisée en cas d'urgence, la césarienne est devenue une pratique courante de nos jours et concerne 1 grossesse sur 5 en France (chiffres issus de l'enquête nationale périnatale de 2010). Cette intervention chirurgicale consiste à extraire le nouveau-né de l'utérus de la mère par incision de la paroi utérine. Depuis quelques années, la communauté scientifique a démontré que cette pratique pouvait influencer la colonisation de l'intestin par le microbiote. En effet, les enfants nés par césarienne ont un microbiote proche de celui retrouvé sur la peau alors que les enfants nés par voie basse ont un microbiote qui ressemble à celui du vagin de la mère. En effet, Dominguez-Bello M.G. *et al.* ont montré que moins de 24 heures après l'accouchement le profil microbien des enfants nés par voie basse ressemblait à celui du vagin de la mère et qu'il était dominé par des espèces de *Lactobacilles*, *Prevotella* et *Sneathia*. A l'inverse, les enfants nés par césarienne sont colonisés par des bactéries proches de celles retrouvées sur la peau de la mère comme les *Staphylocoques*, les *Corynebactéries* et les *Propionibactéries*¹⁹. Par

ailleurs, une étude récente a rapporté que le microbiote intestinal des enfants nés par voie basse était également proche du microbiote intestinal de la mère suggérant également une transmission fécale de la mère à l'enfant²⁰. De plus, Jakobsson H.E. *et al.* ont mis en évidence que les enfants nés par césariennes possédaient un microbiote moins diversifié et qu'ils étaient moins souvent colonisés par des *Bacteroidetes* que les enfants nés par voie basse²¹. Les différences majeures observées entre le microbiote des enfants nés par césarienne et ceux nés par voie basse s'estompent au cours du temps²⁰. Néanmoins, cette acquisition différentielle de microbiote n'est pas sans conséquence et les enfants nés par césarienne ont également une maturation différente du système immunitaire²¹.

Afin de lisser les différences de microbiote induites par le mode d'accouchement, une équipe américaine a badigeonné le nouveau-né de fluide vaginal provenant de sa mère²². Le microbiote des enfants nés par césarienne et exposés aux bactéries vaginales était beaucoup plus proche du microbiote d'enfants nés par voie basse que celui d'enfants nés par césarienne non exposés. Ainsi, cette étude a montré que qu'il était possible de réduire l'impact de la césarienne sur le microbiote en inoculant au nouveau-né le microbiote vaginal de sa mère.

L'impact du mode d'accouchement sur la colonisation précoce de l'intestin par le microbiote n'est pas négligeable mais bien d'autres facteurs participent à sa maturation. En effet, plusieurs études ont mis en évidence que le microbiote de jumeaux pouvait être taxonomiquement et fonctionnellement différent l'un de l'autre^{23,24}. Pourtant les jumeaux ont partagé le même environnement microbien à la naissance et ont probablement été colonisés par les mêmes bactéries au départ. Récemment, Daft J.G. *et al.* ont effectué une manipulation simple pour quantifier l'importance des bactéries héritées à la naissance par la mère sur le développement du futur microbiote²⁵. Les auteurs ont utilisé deux lignées de souris distinctes ayant des microbiotes différents. Les auteurs ont ensuite coordonné les accouplements des couples reproducteurs des lignées de telle sorte à avoir des naissances simultanées dans les 2 colonies de souris. Quarante-huit heures après la naissance des souriceaux, ils ont interverti les portées pour que chaque mère d'une lignée allaite les souriceaux de l'autre lignée. Les auteurs ont pu mettre en évidence que le microbiote des souriceaux était bien plus proche du microbiote de la mère nourricière que de celui de leur mère biologique. Ces résultats suggèrent que la transmission du microbiote de la mère à l'enfant n'est pas uniquement effectuée à la naissance et que la mère nourricière joue un rôle primordial²⁵. Par ailleurs, une autre étude a montré que le microbiote de l'enfant était proche du microbiote de sa mère mais également proche de celui de son père²⁶. Ces données suggèrent donc que d'autres facteurs environnementaux participent à l'acquisition et à la maturation du microbiote.

3) Les conditions d'hygiène et l'environnement

L'impact des conditions d'hygiène sur l'acquisition du microbiote est assez intuitif. En effet, pour qu'une bactérie colonise notre tube digestif il faut qu'elle ait eu l'occasion d'y entrer un moins une fois ! Plus les conditions d'hygiène périnatales sont strictes moins l'enfant est susceptible d'entrer en contact avec une variété importante de microorganismes. Ainsi, il a été démontré que l'exposition du nouveau-né à un environnement riche en microorganismes entraînait une augmentation de la diversité de son microbiote. Par exemple, le microbiote

d'enfants vivant à la ferme est bien plus diversifié que celui d'enfants vivant dans un environnement plus aseptisé²⁷. Par ailleurs, l'équipe de J.I. Gordon a mis en lumière des microbiotes similaires chez les membres d'une même famille partageant le même environnement. Ces résultats sont retrouvés à la fois dans des familles américaines mais aussi dans des familles africaines et sud-américaines²⁶. Cependant, dans cette étude il a été impossible de séparer l'effet des conditions d'hygiène environnementales de l'influence d'autres facteurs comme le régime alimentaire. Chez la souris, il est bien sûr plus facile de contrôler l'influence de la transmission maternelle, du régime alimentaire et de l'environnement sur le microbiote. Dans une étude parue en 2012, l'équipe New Yorkaise de E.G. Palmer a apporté quelques éléments de réponse concernant l'influence de l'environnement sur le microbiote²⁸. Dans cet article, les auteurs ont comparé le microbiote intestinal de plusieurs lignées de souris invalidées pour des gènes impliqués dans l'immunité innée comme MyD88, TLR2, TLR4, TLR5 ou TLR9 (MyD88 pour Myeloid Differentiation primary response gene 88 et TLR pour Toll-Like Receptor). Tous ces gènes sont chargés de reconnaître différents composés bactériens. Pour chaque lignée, les auteurs ont croisé une femelle et un mâle tous deux hétérozygotes pour la délétion. Chaque membre de la descendance a été placé en cage individuelle après le sevrage et le microbiote de l'iléon, de la muqueuse iléale et du caecum a été analysé après 6 semaines. Les auteurs ont constaté, en comparant les souris invalidées aux souris sauvages, qu'aucun des génotypes n'avait induit de modification du microbiote. Par contre, chaque colonie de souris arborait un microbiote distinct quel que soit le génotype des souris. Ces résultats mettent en lumière que l'environnement et le lignage des souris sont primordiaux pour le développement du microbiote²⁸. Ces résultats sont extrêmement importants à considérer lors de comparaison entre les microbiotes de souris sauvages et de souris invalidées.

Un autre exemple bibliographique illustre parfaitement ce concept. Dans une étude publiée dans la revue *Science* en 2010, Vijay-Kumar M. *et al.* ont démontré que les souris invalidées pour le récepteur TLR-5 développaient un syndrome métabolique caractérisé entre autres par une hyperphagie, une augmentation de la masse grasse et une intolérance au glucose²⁹. TLR-5 est un récepteur capable de reconnaître la flagelline, un composant présent chez certaines bactéries mobiles du microbiote. En comparant le microbiote des souris sauvages au microbiote des souris TLR-5 KO (KO pour Knock Out), les auteurs ont constaté des modifications au niveau des espèces. Le transfert du microbiote modifié issu des souris TLR-5 KO dans des souris axéniques a été suffisant pour transférer le phénotype métabolique. A la lumière de ces résultats, les auteurs ont émis l'hypothèse que la perte du récepteur TLR-5 induirait des altérations du microbiote intestinal conduisant au développement des maladies métaboliques²⁹. En 2016, une autre étude publiée par Zhang W. *et al.* s'est intéressée au rôle du TLR-5 dans le développement des maladies métaboliques³⁰. Les auteurs ont également généré des souris invalidées pour TLR-5 mais ils n'ont pas constaté l'apparition des désordres métaboliques chez ces souris. Par ailleurs, les auteurs n'ont également pas réussi à mettre en évidence de changement significatif de microbiote entre des souris sauvages et des souris TLR-5 KO³⁰. Le microbiote présent dans leur lignée de souris TLR-5 KO était complètement différent de celui identifié lors de l'étude de Vijay-Kumar M. *et al.*. Finalement, l'étude de Zhang W. *et al.* ne remet pas en cause le fait que le microbiote présent dans la lignée de souris TLR-5 KO de Vijay-Kumar M. *et al.* soit responsable du syndrome métabolique. Seulement, ces modifications microbiennes et le syndrome métabolique qui en résulte ne sont pas uniquement dus à l'invalidation du gène TLR-5 mais également à d'autres facteurs comme des modifications environnementales propres à chaque animalerie. Par conséquent, pour évaluer l'impact de

l'invalidation d'un gène sur la composition du microbiote, il est nécessaire de tenir compte de l'origine de la lignée et des conditions d'élevage des souris qui peuvent, à elles seules, impacter la composition du microbiote intestinal.

C. Le régime alimentaire conditionne le microbiote tout au long de la vie

1) Influence du régime alimentaire du nouveau-né sur le développement du microbiote

Concrètement, le microbiote intestinal se nourrit de tout ce qui se trouve dans son environnement comme des résidus alimentaires partiellement absorbés, du mucus produit par nos cellules intestinales, des cellules intestinales ainsi que d'autres bactéries mortes. Néanmoins, quantitativement se sont les fibres alimentaires qui constituent sa principale source énergétique. Autrement dit, les bactéries intestinales se nourrissent essentiellement de ce que nous mangeons et notre régime alimentaire va conditionner le développement du microbiote intestinal.

Le régime alimentaire influence précocement le développement du microbiote. En effet, la première tétée du nourrisson intervient dans les premières heures qui suivent un accouchement sans complications. C'est donc le lait maternel, principale source énergétique pour le nouveau-né, qui permet la croissance des bactéries commensales dans les premiers jours de la vie (les bactéries commensales sont les bactéries non pathogènes qui colonisent les muqueuses de l'organisme et l'intestin). Le lait maternel humain est composé d'énormément de substances bioactives comme des oligosaccharides^{31,32}. Ces oligosaccharides (aussi appelé fibres solubles) ne sont ni absorbés ni métabolisés dans les parties hautes de l'intestin et arrivent intacts dans le côlon au contact des bactéries intestinales³³. Ces composés maternels peuvent donc être métabolisés par le microbiote intestinal et promouvoir la croissance des genres bactériens *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*^{34,35}. La composition du lait maternel en oligosaccharides peut varier d'une mère à l'autre. En effet, une étude récente publiée par le laboratoire de J.I. Gordon, fait état d'une diminution de près de 20% d'oligosaccharides sialylés dans le lait des mères ayant des enfants dénutris³⁶. Loin d'être une simple coïncidence, les auteurs suggèrent que cette diminution est en partie impliquée dans l'état dénutri de l'enfant. En effet, des souris traitées avec ces oligosaccharides sialylés ont une meilleure croissance (augmentation de la masse maigre et du volume osseux) que des souris non traitées. De plus, l'effet des oligosaccharides sur la croissance est perdu chez des souris axéniques (*i.e.* souris nées et élevées en condition stérile et dépourvues de microbiote) ce qui suggère le rôle prépondérant du microbiote dans ces phénomènes. Cette étude montre qu'en agissant sur le microbiote, ces composés maternels peuvent avoir des effets majeurs sur le bon développement de l'enfant.

Mais qu'en est-il pour le développement des enfants nourris avec du lait maternisé ? Plusieurs études ont répertorié des différences entre la composition du microbiote d'enfants nourris au lait maternel et celui d'enfants nourris au biberon de lait maternisé^{37,38}. Dans ces

études les auteurs ont constaté, entre autres, un retard dans la colonisation de l'intestin par des *Bifidobactéries* chez les enfants nourris par du lait maternisé. Néanmoins, ces études sont anciennes et de gros progrès ont été faits dans la conception du lait maternisé et des laits enrichis en oligosaccharides ont depuis vu le jour. Les enfants nourris avec cette nouvelle génération de lait ont des taux de *Bifidobactéries* dans les fèces similaires aux nouveaux-nés nourris au lait maternel³⁹. Pourquoi tenir compte de la quantité de *Bifidobactéries* ? Au-delà de leur capacité à digérer les oligosaccharides, les *Bifidobactéries* peuvent adhérer à l'épithélium intestinal⁴⁰. Cette propriété leur permet de participer à la maturation du système immunitaire et de l'épithélium intestinal du nouveau-né⁴¹⁻⁴⁴. Leur présence précoce dans l'intestin du nouveau-né permet donc un développement complet du tractus digestif de l'enfant.

Par la suite, à chaque changement du régime alimentaire, le microbiote va devoir s'adapter à la nourriture qui lui est proposée. Dans une étude cas témoin, Koenig J.E. *et al.* ont suivi l'évolution du microbiote intestinal d'un nouveau-né pendant 2 ans et demi⁴⁵. Ils ont pu mettre en évidence de profondes modifications du microbiote intestinal lors des changements de régime alimentaire. En outre, l'arrêt de l'allaitement et l'introduction de nourriture solide va profondément modifier la proportion des différentes bactéries intestinales²⁰. La diversité microbienne intestinale augmente progressivement après la naissance et c'est vers l'âge de 2 ans environ que le microbiote se stabilise pour être fonctionnellement proche de celui retrouvé à l'âge adulte^{20,26} (**Figure 4**).

2) Le régime alimentaire chez l'adulte et son impact sur le microbiote

Nous avons vu que le microbiote est influencé dès la naissance par le lait maternel et que la transition entre lait et nourriture solide va induire sa maturation finale. Dans cette partie nous verrons que l'impact du régime alimentaire ne s'arrête pas là et perdure tout au long de la vie.

Pour mieux se rendre compte de l'impact du régime sur le microbiote, l'équipe de J.I. Gordon a comparé le microbiote intestinal de 59 espèces de mammifères différentes. Parmi ces espèces, le microbiote des mammifères carnivores était moins diversifié que celui des herbivores lui-même moins diversifié que le microbiote des omnivores⁴⁶. De plus, dans une autre étude la même équipe a montré que les bactéries intestinales présentes dans l'intestin des carnivores et des herbivores avaient des fonctions bien différentes⁴⁷. En effet, le microbiote des mammifères carnivores possède beaucoup plus de gènes impliqués dans la dégradation des protéines et des acides aminés que le microbiote des herbivores. A l'inverse, la communauté microbienne des herbivores a un répertoire génique enrichi en enzymes impliquées dans la synthèse protéique. Ces résultats assez intuitifs suggèrent que le régime alimentaire conditionne la survie des espèces dans l'intestin. Le microbiote serait donc avant tout le reflet de notre régime alimentaire.

Chez l'Homme, la teneur en sucres et en fibres du régime alimentaire est un facteur déterminant pour la composition du microbiote. En effet, le simple changement du type ou de la quantité de sucres dans le régime peut induire des changements rapides de la composition du microbiote intestinal⁴⁸⁻⁵⁰. Chez la souris, l'impact du régime alimentaire sur le microbiote est encore mieux décrit. En effet, le passage d'un régime riche en fibres et pauvre en gras à un régime pauvre en fibres et riche en gras bouleverse la composition du microbiote en seulement

quelques jours⁵¹. Ces modifications ne dépendent pas du génotype de la souris car quel que soit la souche murine utilisée le régime alimentaire impacte de la même façon le microbiote⁵².

Par ailleurs, il existe d'autres preuves indirectes que le microbiote intestinal est sous l'influence du régime alimentaire. Le microbiote fécal d'adultes américains est très différent de ceux retrouvés chez des individus africains ou sud-américains. Les microbiotes d'adultes sud-américains et africains sont proches malgré l'éloignement géographique. Dans cette étude, l'analyse de la composition des différents régimes alimentaires indique que les populations sud-américaines et africaines se nourrissent principalement de sucres issus des plantes alors que les individus américains ont un régime riche en protéines²⁶. Cette association a été confirmée dans une autre étude où des volontaires sains ont mangé successivement deux types de régime, l'un riche en fibres et l'autre riche en protéines animales. L'analyse quotidienne de leurs microbiotes a mis en évidence des modifications rapides et reproductibles des proportions relatives de plusieurs bactéries intestinales⁵³.

La teneur en fibres alimentaires de l'alimentation est un des facteurs clés conditionnant l'impact du régime sur le microbiote. Ces fibres sont principalement issues de la paroi des fruits et des légumes présents dans notre alimentation. Elles sont composées de monosaccharides liés entre eux par des liaisons glycosidiques. Ces fibres alimentaires arrivent intactes dans les parties basses de l'intestin au contact des bactéries car nous ne disposons pas des enzymes capables de cliver ces liaisons glycosidiques. C'est tout le contraire des bactéries intestinales qui elles possèdent différentes glycosides hydrolases et polysaccharides lyases qui peuvent dégrader les fibres alimentaires^{54,55}. La libération des monosaccharides issus des fibres constitue la source énergétique la plus utilisée par le microbiote⁵⁶. Chez l'Homme comme chez la souris, la consommation d'un régime riche en fibres alimentaires est associée avec une plus grande diversité microbienne⁵⁷. Chez des hommes obèses, la réduction des calories associée à l'augmentation des fibres du régime a permis d'augmenter la diversité du microbiote⁵⁸. Au contraire, la faible consommation de fibres entraîne une diminution de la diversité microbienne^{57,59}. Par ailleurs, cette perte de diversité n'est pas totalement restaurée lors de la réintroduction des fibres dans le régime alimentaire⁶⁰. Ces résultats suggèrent que la faible teneur en fibres du régime peut aboutir à l'extinction irréversible d'espèces microbiennes. Dans ces conditions, l'ajout de fibres dans le régime permet uniquement de nourrir les bactéries encore présentes dans l'intestin mais en aucun cas de rétablir les bactéries disparues. Dans ce cas, le seul moyen de restaurer la diversité bactérienne serait de réimplanter les espèces perdues directement dans l'intestin tout en continuant la consommation des fibres. Les méthodes utilisées pour réintroduire des bactéries vivantes dans le tractus digestif seront détaillées dans la 3^{ème} partie de l'introduction du manuscrit (**cf Introduction III-C**).

L'ensemble de ces données démontre que le régime alimentaire est capable d'induire de profondes modifications du microbiote intestinal tout au long de la vie. Une étude à grande échelle effectuée par le consortium MetaHIT (Metagenomics of the Human Intestinal Tract), a permis de classer plusieurs centaines d'individus en 3 grands groupes simplement en analysant leurs microbiotes intestinaux³. Ces 3 groupes, appelés entérotypes, sont articulés autour de 3 genres bactériens. Ainsi, les personnes appartenant à l'entérotipe 1 ont un microbiote dominé par le genre *Bacteroides*, l'entérotipe 2 est dominé par le genre *Prevotella* et l'entérotipe 3 est dominé par le genre *Ruminococcus*. De manière intéressante la répartition des individus dans ces 3 entérotypes ne dépend pas de leur origine géographique, de leur état de santé (surpoids ou maladies inflammatoires de l'intestin), de leur sexe ou de leur âge. Par contre, Wu G.D. *et al.*, ont

pu mettre en évidence que le régime alimentaire des individus pouvait expliquer la répartition des individus dans les entérotypes⁶¹. Ainsi, les personnes ayant un microbiote dominé par le genre *Prevotella* ont un régime alimentaire enrichi en glucides et pauvre en viandes, à l'inverse l'entérotipe *Bacteroides* est associé à un régime riche en viandes et en graisses saturées. Néanmoins, l'entérotipe *Ruminococcus* n'a pas pu être clairement associé avec un régime alimentaire particulier. Cette association est en accord avec une étude précédente qui comparait le microbiote d'enfants burkinabes à celui d'enfant italiens. Les enfants africains qui avaient un régime alimentaire pauvre en viandes et graisses animales étaient colonisés par le genre *Prevotella*. A contrario, les enfants italiens avaient des taux élevés du genre *Bacteroides*⁶².

D. Relation hôte-microbiote en physiologie

Comme nous l'avons vu précédemment, l'intestin est habité par environ cent mille milliards de bactéries. Cette colonisation du tractus digestif est considérée comme un événement crucial pour le bon développement de l'organisme. Pour le démontrer, la communauté scientifique a comparé des animaux nés et élevés en conditions stériles et donc dépourvus de microbiote intestinal (on parle dans ce cas d'animaux axéniques) avec des animaux naturellement colonisés par un microbiote (appelés animaux conventionnels). Les animaux axéniques sont caractérisés entre autres par un système immunitaire atrophié et un intestin immature et très perméable⁶³. L'impact du microbiote sur l'intestin ainsi que sur le système immunitaire est assez intuitif. De manière plus surprenante, de nombreuses études récentes ont montré que le microbiote pouvait jouer un rôle dans bien d'autres fonctions physiologiques et même influencer le comportement⁶⁴. Nous verrons dans cette partie comment le microbiote communique avec l'hôte et quels sont ses rôles dans le bon fonctionnement de l'organisme.

1) Influence du microbiote sur la physiologie de l'intestin

a. Microbiote et transit intestinal

Le transit intestinal est assuré par des mouvements péristaltiques. Il permet le cheminement du bol alimentaire dans le tractus digestif et évite la stagnation et la prolifération trop importante des bactéries dans l'intestin. En effet, un transit trop lent dans l'intestin grêle peut être responsable d'une hyperprolifération de bactéries commensales⁶⁵. Cette augmentation anormale de bactéries dans l'intestin grêle n'est pas anodine et elle a été associée à plusieurs états pathologiques comme la stéatose hépatique^{66,67}. On peut se demander comment des bactéries présentes dans l'intestin grêle peuvent impacter le foie. Un élément de réponse pourrait venir de la métabolisation des acides biliaires par les bactéries intestinales. En effet, les bactéries peuvent métaboliser les acides biliaires et ainsi modifier leurs structures. En condition physiologique, ce métabolisme est effectué majoritairement dans le côlon. Cependant, lors de la prolifération de bactéries dans l'intestin grêle ce métabolisme peut avoir lieu dans les parties

proximales avant la réabsorption iléale des acides biliaires. Cela peut aboutir à une profonde modification des taux d'acides biliaires sanguins et donc moduler le métabolisme hépatique⁶⁶.

Le rôle du transit sur le microbiote intestinal est assez bien décrit mais quand est-il de l'impact du microbiote intestinal sur le péristaltisme intestinal ? Les effets du microbiote sur le transit sont assez controversés. En effet, deux études parues en 2013 ont étudié l'effet du microbiote intestinal sur le transit. Dans la première étude, Kashyap P.C. *et al.*, ont comparé la vitesse de transit intestinal entre des souris axéniques et des souris colonisées⁶⁸. Ils ont pu observer que l'ajout d'un microbiote intestinal dans les souris axéniques entraînait un ralentissement significatif du transit suggérant un effet inhibiteur des bactéries intestinales. A l'inverse, Wichmann A. *et al.* ont mesuré un transit plus lent chez des souris axéniques comparées à des souris conventionnelles. Les auteurs suggèrent ici que le transit plus lent chez les souris axéniques est dû à une augmentation de la sécrétion de GLP-1 (Glucagon-Like Peptide 1) par l'intestin, une hormone connue pour ses effets inhibiteurs sur la motricité intestinale⁶⁹. Ces deux études paraissent contradictoires aux vues des effets opposés du microbiote sur le transit. Néanmoins, il est important de rappeler que le microbiote n'est pas une entité homogène mais l'association en proportions variables de milliers de bactéries différentes. Il est donc probable que 2 microbiotes différents puissent avoir des effets opposés sur le transit d'une souris axénique. En effet, l'équipe de J.I. Gordon a démontré en 2015, que des microbiotes différents (issus d'individus vivants aux 4 coins du monde) pouvaient exercer des effets diamétralement opposés sur le transit de souris colonisées. De plus, les effets du microbiote sur le transit sont conditionnés par le régime alimentaire. A titre d'exemple, des souris colonisées avec un microbiote provenant d'une personne américaine ont un transit plus rapide que des souris colonisées avec un microbiote d'un individu bangladais uniquement quand ces souris mangent un régime typique du Bangladesh. A l'inverse, quand ces souris mangent un régime dit « continental » ce sont les souris colonisées avec un microbiote provenant d'un américain qui ont le transit le plus lent⁷⁰.

b. Microbiote et barrière intestinale

L'intestin constitue la plus grande surface d'échange entre l'organisme et le milieu extérieur. La paroi intestinale a donc un double rôle, d'une part permettre l'absorption des nutriments, d'autre part assurer une fonction de barrière en empêchant l'intrusion dans l'organisme de bactéries potentiellement pathogènes, de virus et de toxines. Cette barrière est constituée par plusieurs acteurs aux fonctions complémentaires. Premièrement, le mucus et l'épithélium intestinal ont un rôle de barrière physique séparant nettement les composés présents dans la lumière de la muqueuse. Ensuite, les cellules épithéliales ont la capacité de sécréter des peptides antimicrobiens et autres défencines et donc d'ériger ce que l'on pourrait appeler une barrière chimique. Cette barrière permet la destruction des agents pathogènes avant leur entrée dans la muqueuse. Enfin, un important dispositif immunitaire constitué d'anticorps et de cellules aux propriétés phagocytaires et cytotoxiques est mis en place dans la muqueuse intestinale (**Figure 5**).

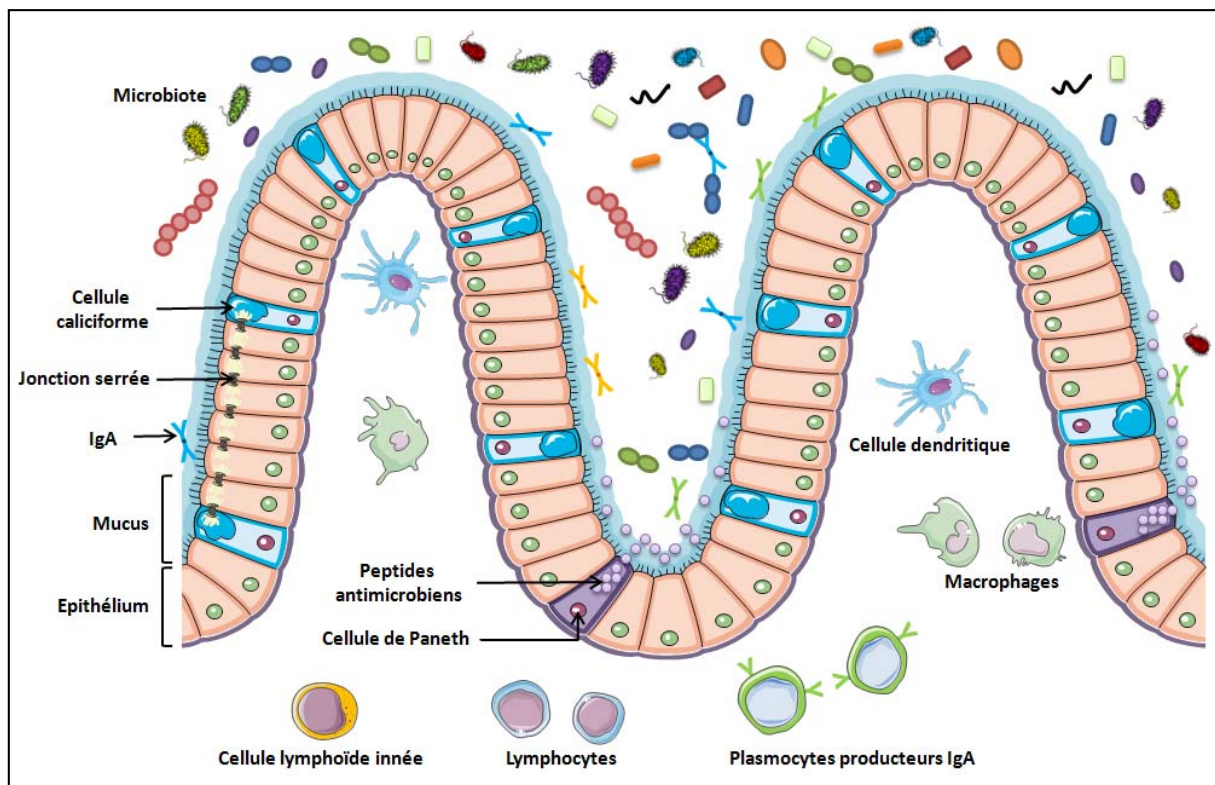


Figure 5: Organisation schématique de la barrière intestinale.

La barrière intestinale est constituée d'une couche de mucus (en bleu) tapissant l'épithélium (en orange). Le mucus contient des peptides antimicrobiens sécrétés par les cellules de Paneth (violet) et des anticorps IgA (Immunoglobulines de type A) produit par les plasmocytes (en vert). Les cellules épithéliales sont reliées au pôle apical par des jonctions serrées limitant les espaces intercellulaires et assurant l'étanchéité relative de l'épithélium. Un important contingent de cellules immunitaires est présent dans la muqueuse comme les macrophages, les cellules dendritiques, les plasmocytes, les lymphocytes et les cellules lymphoïdes innées. Ces cellules vont prendre en charge les composés bactériens, les virus ou encore les toxines capables de traverser l'épithélium.

i) Microbiote et mucus

L'intestin est tapissé par une couche de mucus intestinal produite par des cellules dites caliciformes. La fonction majeure attribuée au mucus est un rôle protecteur de l'épithélium intestinal. Ce mucus est composé de grandes protéines fortement glycosylées : les mucines. Dans l'intestin grêle, le mucus est constitué d'une seule couche peu épaisse. A l'opposé, le mucus du côlon est plus épais et réparti en deux couches : une couche interne dense et attachée à l'épithélium et une couche externe plus lâche dans laquelle séjourne certaines bactéries du microbiote. La présence de mucus est indispensable à une bonne cohabitation entre les bactéries et l'hôte. En effet, le rôle premier du mucus est de tenir à distance les bactéries commensales de l'épithélium et ainsi éviter une trop grande stimulation du système immunitaire. Ainsi, en condition physiologique la couche interne de mucus (au contact de l'épithélium) est considérée comme stérile⁷¹. Le mucus colique est structuré autour d'un réseau de mucines 2 sécrétées par les cellules caliciformes. Lorsque des souris sont invalidées pour le gène codant pour la mucine 2 il est constaté un contact direct entre le microbiote et l'épithélium⁷¹. Dans ces conditions, les souris développent spontanément une colite très sévère associée à une inflammation intestinale majeure. Dans un autre article, Ju J. *et al.*, ont montré que l'invalidation d'un gène impliqué dans

la glycosylation des mucines pouvait également induire un défaut d'assemblage du mucus et ainsi conduire au développement de colites spontanées chez la souris⁷². De manière générale, la défaillance de cette barrière protectrice permet le contact entre l'épithélium et le microbiote et conduit à une inflammation intestinale^{73,74}. Nous verrons par la suite que lors d'un dysfonctionnement de la barrière physique, le système immunitaire s'active afin d'éviter l'entrée massive de bactéries commensales dans l'organisme.

Au-delà de son rôle protecteur, le mucus constitue une source de carbones non négligeable pour certaines bactéries intestinales dites mucolytiques. La dégradation des mucines par des exoglycosidases et des protéases bactériennes peut produire des monosaccharides utilisables comme source énergétique et des acides aminés⁷⁵. De plus, des travaux récents ont montré qu'en plus de se nourrir de mucus les bactéries intestinales pouvaient contrôler son épaisseur⁷⁶. Les auteurs de l'étude ont montré que des souris ayant un microbiote riche en bactéries appartenant au phyla des Protéobactéries et des TM7 avaient un mucus plus fin et colonisé par plus de bactéries⁷⁶.

ii) Microbiote et épithélium intestinal

Les épithélia sont des tissus de revêtement recouvrant la surface externe et les cavités internes de l'organisme. Ils sont constitués d'une ou plusieurs couches de cellules juxtaposées et reliées entre elles par des jonctions intercellulaires. Par exemple, la barrière épithéliale de la peau (épiderme) est la barrière biologique la plus imperméable du corps. Elle est constituée de plusieurs couches de cellules et elle prévient des agressions et de l'infection systémique. L'épithélium du tubule rénal, quant à lui, assure le transport actif et passif de solutés afin de maintenir la composition correcte de l'urine et du sang. Pour ce faire, il est constitué d'une monocouche de cellules permettant ainsi un meilleur transport. La barrière épithéliale intestinale a une charge beaucoup plus difficile : elle doit défendre l'organisme contre l'environnement extérieur, comme la peau, mais également assurer un transport actif et passif, comme le tubule rénal. Pour cela, l'épithélium est constitué d'une seule couche de cellules reliées entre elles par des jonctions serrées. Cette monocouche cellulaire n'est pas plane mais elle forme de nombreux replis appelé villosités qui favorisent l'absorption des nutriments. Ces villosités sont particulièrement longues dans l'intestin grêle et quasiment inexistantes dans le côlon où la surface épithéliale est plane.

Plusieurs populations cellulaires composent cet épithélium : les entérocytes, les cellules endocrines, les cellules caliciformes, les cellules de Paneth, les cellules M et les cellules souches intestinales. Sans rentrer dans les détails, j'aimerais apporter quelques précisions sur le rôle et l'organisation de ces différentes cellules.

Les entérocytes constituent le type cellulaire majoritaire de l'épithélium intestinal. Ce sont les cellules impliquées dans l'absorption des nutriments.

Les cellules entéroendocrines sécrètent des hormones gastro-intestinales impliquées dans la motricité du tube digestif, le contrôle de la prise alimentaire, ou la régulation de la glycémie (**cf Introduction II-A-1)-b.**).

Comme nous l'avons vu précédemment **les cellules caliciformes** sécrètent le mucus.

Les cellules de Paneth sécrètent des peptides antimicrobiens. Ces cellules se situent dans l'intestin grêle et sont particulièrement abondantes dans l'iléon.

Les cellules souches sont situées au fond des cryptes villositaires. Elles peuvent se différencier en tous les autres types cellulaires de l'épithélium. Le renouvellement de l'épithélium intestinal est très rapide, en seulement quelques jours toutes les cellules sont remplacées.

L'ensemble de ces cellules est relié par des jonctions intercellulaires. Il existe plusieurs types de jonctions permettant l'étanchéité et la cohésion mécanique de l'épithélium. Les jonctions serrées sont situées au pôle apical des cellules épithéliales. Au plan moléculaire, les jonctions serrées sont composées de protéines transmembranaires (occludine, claudines et JAM-A, Junctional Adhesion Molecule-A) auxquelles se fixent les protéines intracellulaires (ZO, *Zonula Occludens*), ces dernières assurant la liaison avec les protéines du cytosquelette (les filaments d'actine). En condition physiologique, ces jonctions ne laissent passer que des molécules hydrosolubles de faible poids moléculaire (**Figure 6**). La description de ces jonctions serrées donne l'impression d'une structure figée, une sorte de ciment inerte entre les entérocytes. C'est tout le contraire et la perméabilité paracellulaire est finement régulée au cours du temps. Par exemple, l'arrivée du bol alimentaire dans l'intestin grêle et l'absorption du glucose par les entérocytes conduit à une ouverture des jonctions serrées⁷⁷. Par ailleurs, certaines hormones sont connues pour réguler la perméabilité. Ainsi, les œstrogènes sont capables de diminuer la perméabilité intestinale en augmentant l'expression des protéines de jonctions serrées⁷⁸.

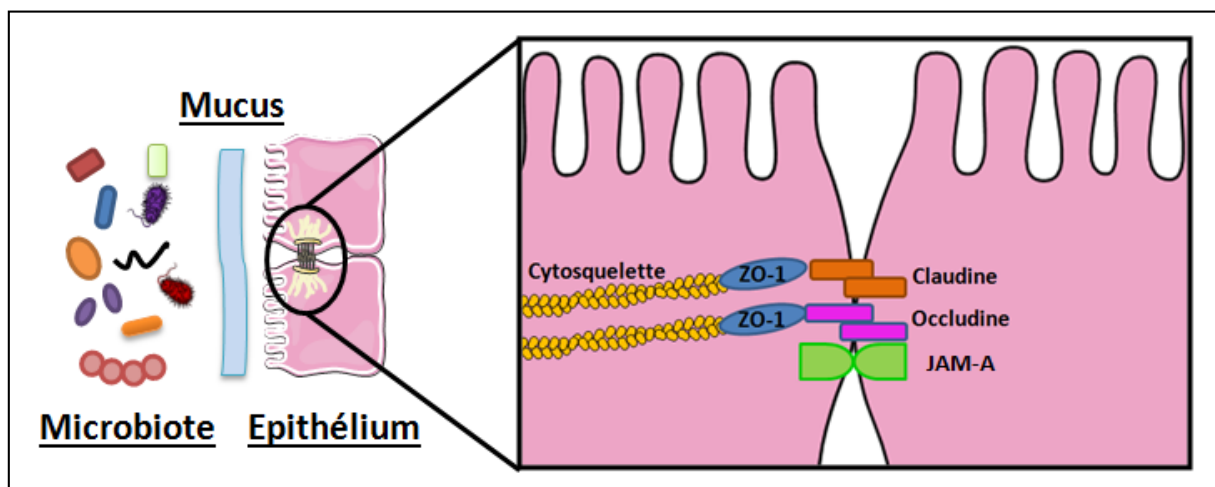


Figure 6: Structure d'une jonction serrée.

Les jonctions serrées sont constituées de plusieurs types de protéines. Des protéines transmembranaires comme Claudine, Occludine et JAM-A qui assurent le rapprochement des membranes plasmiques de 2 cellules épithéliales adjacentes. Ensuite il existe des protéines comme ZO-1 qui permettent la liaison des protéines transmembranaires aux filaments du cytosquelette. Les jonctions serrées sont présentes au pôle apical des entérocytes et limitent le passage de composés entre les cellules épithéliales intestinales (ZO-1 : Zonula Occludens 1; JAM-A Junctional Adhesion Molecule-A).

L'épithélium intestinal joue un rôle clef dans la coordination des défenses intestinales. En effet celui-ci n'est pas seulement une barrière passive, il joue également un rôle d'interface privilégié pour « les dialogues entre le microbiote intestinal et l'organisme ». Les cellules de l'épithélium possèdent plusieurs types de récepteurs capables de reconnaître des fragments

bactériens comme les récepteurs TLR (Toll Like Receptor) ou NOD like receptor (Nucleotide Oligomerisation Domain like receptor). Ces récepteurs reconnaissent des fragments contenus dans la paroi des bactéries (comme les LPS (LipoPolySaccharides) ou les peptidoglycanes) ou de l'ADN bactérien. Ils peuvent être localisés à la membrane (TLR) ou dans le cytoplasme des entérocytes (NOD like récepteur). L'activation de ces récepteurs peut aboutir à la libération de mucus par les cellules caliciformes ou de peptides antimicrobiens par les entérocytes. Ces sécrétions vont alors limiter le contact entre les cellules épithéliales et le microbiote. Dans des travaux récents, une équipe japonaise a mis en évidence un nouveau mécanisme par lequel l'épithélium garde ses distances avec le microbiote⁷⁹. Les auteurs de l'étude ont pu montrer que l'épithélium intestinal était à même de sécréter une protéine capable de bloquer le déplacement des bactéries dotées d'un flagelle. Cette protéine nommée Lypd8 peut se lier au flagelle des bactéries et diminuer fortement leur migration dans le mucus. Par ailleurs, chez les souris invalidées pour Lypd8, la couche interne de mucus est habitée par les bactéries flagellées et ces souris développent facilement une inflammation intestinale⁷⁹.

Le microbiote intestinal est également capable de moduler l'épithélium et la perméabilité des jonctions serrées. En effet, la fermentation des fibres alimentaires par le microbiote va permettre la production d'acides gras à chaîne courte qui constituent la principale source énergétique des entérocytes du côlon⁸⁰. Chez les souris axéniques, les entérocytes n'ont pas de butyrate comme source énergétique. Dans ces conditions ils arborent un phénotype caractéristique d'une cellule privée d'énergie : leurs taux d'ATP (Adénosine TriPhosphate) et de NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide + H⁺) intracellulaires sont faibles, le cycle de Krebs est ralenti et les cellules initient des processus d'autophagies. L'autophagie est la dégradation d'une partie des constituants du cytoplasme d'une cellule par ses propres lysosomes. Elle peut être induite par les conditions de stress cellulaire tels qu'une carence en nutriment comme c'est le cas dans cette étude. La supplémentation en butyrate des souris axéniques permet de corriger ces phénomènes en apportant une source énergétique aux entérocytes. De plus, la colonisation du tractus digestif d'une souris axénique par des bactéries intestinales est capable de modifier complètement le métabolisme des entérocytes aussi bien coliques que jéjunaux^{81,82}. Ces résultats mettent en évidence le rôle majeur des bactéries sur le métabolisme de l'épithélium intestinal. De plus, le butyrate a également été impliqué dans la maturation de la barrière intestinale en induisant la fermeture des jonctions serrées⁸³. D'autres métabolites bactériens ont été identifiés comme étant capables d'induire la maturation des jonctions serrées. C'est le cas de l'acide indole-3-propionate qui est produit par les bactéries et capable de diminuer la perméabilité paracellulaire⁸⁴. A l'inverse, certains composés de la membrane bactérienne comme le LPS peuvent augmenter la perméabilité intestinale^{85,86}.

iii) Microbiote et système immunitaire intestinal

L'intestin est continuellement exposé à une quantité importante d'antigènes et il constitue l'organe le plus riche en cellules immunitaires. La grande majorité des processus immunitaires se déroule dans la *lamina propria* et dans les ganglions mésentériques qui drainent l'intestin. La *lamina propria* est un tissu conjonctif délimité par l'épithélium intestinal d'une part, et la couche musculaire intestinale d'autre part. C'est dans la *lamina propria* que se situe le tissu lymphoïde associé à la muqueuse digestive (GALT pour Gut-Associated Lymphoid Tissue). Le GALT est le plus grand organe de l'immunité et il contient à lui seul 80% des cellules

immunitaires de l'organisme⁸⁷. Plusieurs types de cellules immunitaires y sont retrouvés: les cellules lymphoïdes innées, les cellules présentatrices d'antigènes (comme les macrophages et les cellules dendritiques) et les cellules lymphocytaires B et T (**Figure 7**).

Comme dans le reste de l'organisme 2 types de réponses immunitaires peuvent se mettre en place dans la *lamina propria* : une réponse immunitaire innée et une réponse immunitaire adaptative. La réponse immunitaire innée est rapide et dirigée contre tous les types de bactéries. A l'inverse, la réponse immunitaire adaptative est spécifique d'un antigène bactérien et nécessite l'activation des lymphocytes par des cellules présentatrices d'antigènes. Ces réponses immunitaires doivent être finement régulées et le maintien d'un état de tolérance envers la multitude d'antigènes provenant du microbiote est primordial. En effet, le déséquilibre dans les relations hôte-microbiote peut être à l'origine de maladies inflammatoires intestinales.

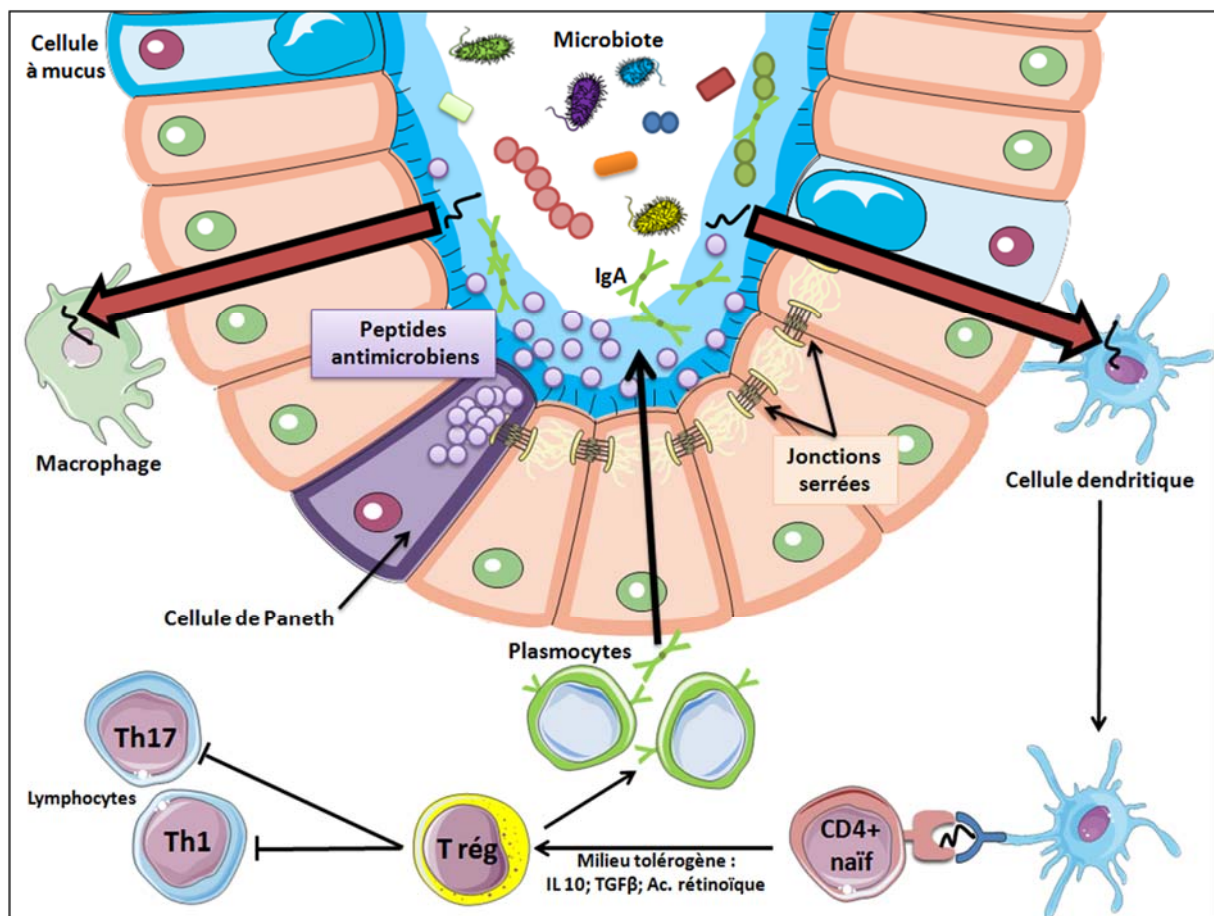


Figure 7: Organisation simplifiée de l'immunité intestinale en condition physiologique.

La lumière intestinale est habitée par plusieurs millions de bactéries. La grande majorité de ces espèces est tenue à distance de l'épithélium par la présence d'une couche de mucus (en bleu) recouverte d'anticorps de type IgA (en vert) et de peptides anti-microbiens (en violet). Néanmoins, certains antigènes ou fragments de bactéries peuvent franchir l'épithélium. Quand cela arrive, ces fragments sont pris en charge par les cellules de l'immunité innée comme les cellules dendritiques et les macrophages. Ces cellules vont alors présenter les antigènes phagocytés aux lymphocytes CD4+ naïfs. Dans la lamina propria, la présence de composés anti-inflammatoires comme IL-10, le TGF-β ou l'acide rétinoïque va orienter la différenciation des lymphocytes naïfs en T régulateurs. Les lymphocytes T régulateurs vont alors s'opposer à la différenciation des lymphocytes Th17 ou Th1 et stimuler la production d'anticorps par les plasmocytes. CD4+: Cluster de Différenciation 4+, IgA: Immunoglobuline A, IL-10: InterLeukine-10; TGF-β Transforming Growth Factor-β; Th17: T helper 17; Th1: T helper 1.

La réponse immunitaire innée met en jeu des phagocytes et les cellules lymphoïdes innées. Afin de déterminer l'importance de cette réponse innée dans le maintien de l'homéostasie intestinale plusieurs études ont analysé le système immunitaire des souris RAG déficientes. Les souris RAG^{-/-} sont invalidées pour les gènes RAG1 ou RAG2 (Recombination-Activating Gene 1/2) qui sont impliqués dans la maturation des récepteurs des lymphocytes T (TCR T Cell Receptor) et B (BCR B Cell Receptor). Sans ces gènes, les souris ne disposent pas de lymphocytes T et B fonctionnels et sont incapables d'élaborer une réponse immunitaire adaptative^{88,89}. Chez ces souris, il n'a pas été constaté de déséquilibre entre le système immunitaire et le microbiote intestinal⁹⁰. Les réponses immunitaires innées semblent donc suffisantes pour contrôler le microbiote intestinal. Dans cette étude, les auteurs ont constaté une forte augmentation des cellules lymphoïdes innées dans la *lamina propria* des souris RAG déficientes, suggérant un rôle majeur de ces cellules dans le maintien de l'homéostasie intestinale⁹⁰. Ces cellules lymphoïdes ont une morphologie et des fonctions proches des lymphocytes mais elles ne sont pas spécifiques d'un antigène bactérien donné. Ces propriétés leur confèrent une rapidité d'action puisque leur recrutement ne dépend pas de leur activation par une cellule présentatrice d'antigène. Néanmoins, la suppression conjointe des lymphocytes et des cellules lymphoïdes innées conduit à une forte inflammation intestinale, des altérations de la muqueuse et du microbiote^{90,91}.

En parallèle de cette réponse immunitaire innée, la phagocytose de fragments bactériens ou des bactéries entières par les cellules présentatrices d'antigènes va permettre l'activation des lymphocytes intestinaux. L'activation des lymphocytes T intestinaux va aboutir à leur différenciation en différents types de lymphocytes effecteurs : les lymphocytes T régulateurs ou les lymphocytes Th₁₇ et Th₁ (T helper 17 et 1). En condition physiologique, la présentation d'antigènes issus du microbiote favorise le développement de lymphocytes T régulateurs (Forkhead box P3 positifs Foxp3⁺) qui s'opposent à l'induction d'une réponse pro-inflammatoire et empêche une inflammation excessive. La fréquence des lymphocytes T régulateurs est bien supérieure dans l'intestin que dans le reste de l'organisme⁹². Ces lymphocytes sont capables de produire des cytokines anti inflammatoires comme l'IL-10 (InterLeukine-10) qui sont nécessaires au maintien de la tolérance de l'organisme face au microbiote intestinal. En conditions physiologiques, la différenciation privilégiée des lymphocytes T en T régulateurs est rendu possible par l'environnement intestinal dit tolérogène, composés d'une multitude de facteurs comme le Transforming Growth Factor- β (TGF- β), IL-10 ou l'acide rétinoïque pour ne citer qu'eux. Ces facteurs favorisent la différenciation en T régulateurs plutôt qu'en Th₁₇ ou Th₁. L'absence des lymphocytes T régulateurs conduit à une réponse immunitaire disproportionnée contre le microbiote intestinal. De plus, la délétion du gène codant pour l'IL-10 dans les lymphocytes T régulateurs est capable d'induire une inflammation intestinale et une colite chez la souris⁹³. En plus de leurs propriétés immunorégulatrices, les lymphocytes T régulateurs sont capables d'induire la production d'IgA (immunoglobulines de type A) par les lymphocytes B intestinaux⁹⁴. Les IgA sont des anticorps capables de traverser l'épithélium intestinal pour être sécrétés dans la lumière⁹². Ils vont alors pouvoir se fixer sur les microorganismes ou les toxines desquels ils sont spécifiques et les inactiver. Les IgA permettent donc de tenir à distance les bactéries commensales de l'épithélium afin d'éviter une trop forte activation du système immunitaire.

Lors d'une infection par un pathogène ou en cas de rupture de la barrière physique, une grande quantité d'antigènes bactériens va pouvoir franchir l'épithélium et se retrouver dans la

lamina propria. Dans ces conditions, la production de cytokines pro-inflammatoires par l'épithélium intestinal et par les cellules de l'immunité innée va aboutir à la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes Th₁₇ ou Th₁. L'induction de cette réponse inflammatoire va pouvoir protéger l'organisme de l'invasion par des pathogènes. Néanmoins, au cours de certaines maladies inflammatoires de l'intestin la réponse immunitaire de type Th₁₇ est disproportionnée et chronique ce qui peut aboutir à des lésions de la paroi de l'intestin.

Le microbiote intestinal est capable d'influencer la différenciation des lymphocytes T en T régulateur ou en Th₁₇. Par exemple, les SFB (Bactéries Segmentées Filamenteuses) induisent une réponse inflammatoire intestinale de type Th₁₇⁹⁵. La capacité des SFB à induire la différenciation des lymphocytes en Th₁₇ réside dans leur capacité à adhérer à l'épithélium. De manière très intéressante, Atarachi K. *et al.*, ont démontré que des bactéries SFB mutantes incapables d'adhérer à l'épithélium ne pouvaient pas induire la prolifération des lymphocytes Th₁₇⁹⁶. A l'inverse, plusieurs souches de *Clostridium* sont capables d'induire des réponses immunitaires anti-inflammatoires en stimulant la prolifération de lymphocytes T régulateurs⁹⁷. La capacité des *Clostridium* à induire la prolifération en lymphocytes T régulateurs est en partie liée à leur capacité à produire des acides gras à chaîne courte. En effet, plusieurs travaux ont montré que ces molécules sont dotées de propriétés anti-inflammatoires en agissant aussi bien sur l'intestin que sur d'autres organes^{59,98}.

2) Influence du microbiote sur la physiologie du foie

Le foie est un des plus gros organes du corps avec un poids d'environ 1500 grammes. Il fait partie avec les poumons des rares organes à bénéficier d'un apport de sang veineux et artériel. En effet, une veine et une artère irriguent le foie : l'artère hépatique apporte le sang riche en oxygène provenant du cœur et la veine porte apporte le sang riche en nutriments provenant de l'intestin. Cette double vascularisation est à la base de la fonction de filtre du foie. Du fait de sa position immédiatement en aval de la circulation sanguine intestinale, le foie reçoit en premier l'ensemble des toxines, des antigènes et autres composés absorbés par l'intestin. Le sang provenant de l'intestin est alors épuré par le foie avant de rejoindre le reste de l'organisme. Cette caractéristique est bien connue des pharmacologues. En effet, lors de l'administration d'un médicament par voie orale, la biodisponibilité de la molécule est en partie conditionnée par sa capacité à franchir la barrière hépatique. Plus le médicament est métabolisé au niveau du foie moins il sera présent dans la circulation générale (**Figure 8**).

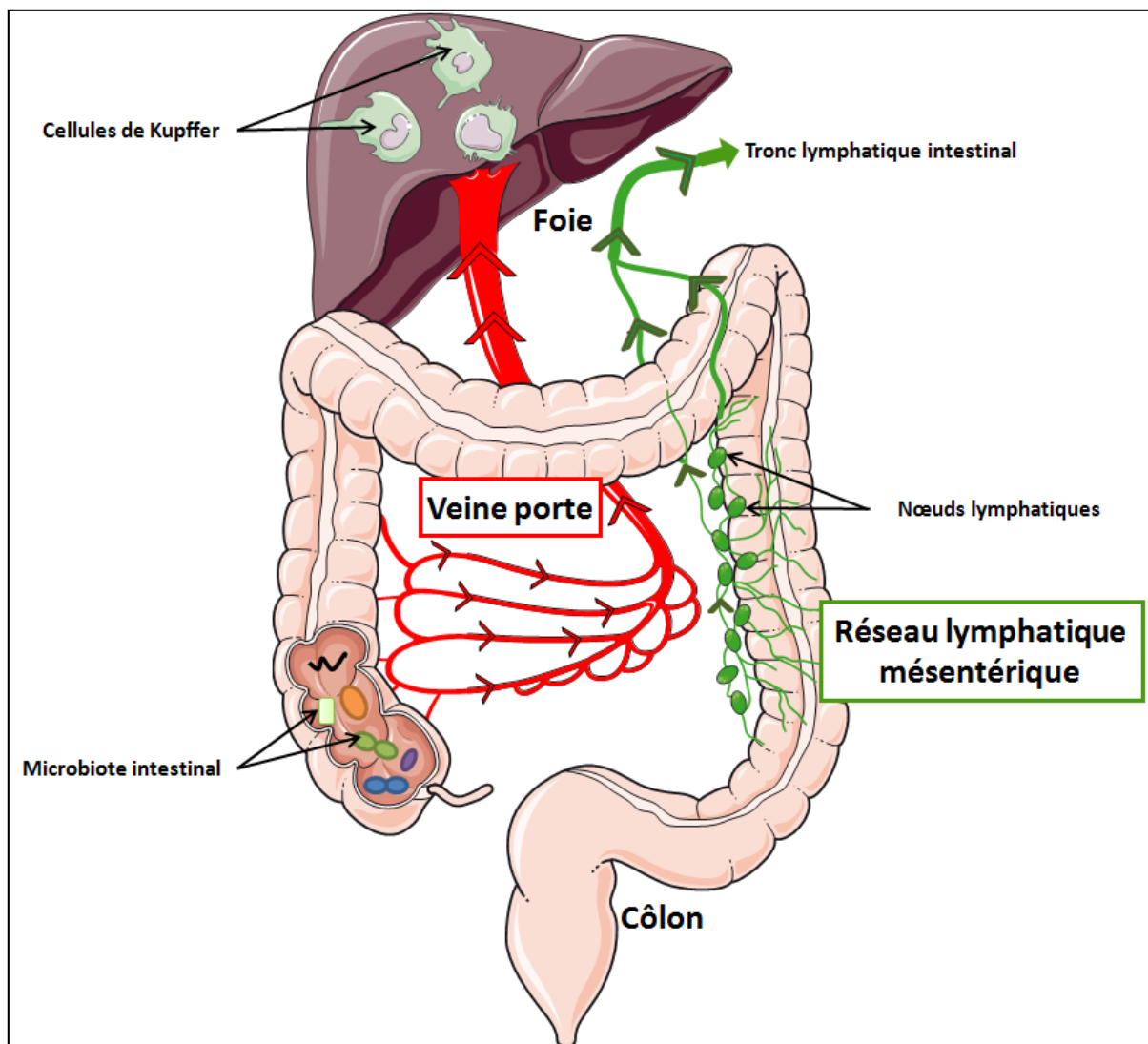


Figure 8: Organisation anatomique du drainage sanguin et lymphatique de l'intestin.

La plupart des composés hydrosolubles absorbés par l'intestin sont acheminés jusqu'au foie par la veine porte (en rouge). Le foie dispose de cellules de Kupffer capables de prendre en charge les composés bactériens issus du microbiote intestinal. Le foie joue alors un rôle de filtre qui s'oppose à la dissémination de ces composés dans le reste de l'organisme. Le réseau lymphatique (en vert) est également un point de contrôle pour les composés franchissant la barrière intestinale. Il est constitué de nombreux nœuds lymphatiques mésentériques drainant l'intestin dans lesquelles réside un important contingent de cellules immunitaires.

Pour faire face au flux continu de molécules bactériennes, le foie possède un important contingent de macrophages résidants, les cellules de Kupffer. Ces macrophages sont chargés de phagocyter et d'éliminer les composés bactériens drainés par la veine porte. A titre d'exemple, il a été démontré que le sang portal était beaucoup plus riche en LPS (un composé de la membrane externe des bactéries gram négatives) que le sang veineux rejoignant la circulation systémique⁹⁹. En effet, les cellules de Kupffer peuvent capter le LPS circulant grâce à l'expression du récepteur au LPS, le TLR4 et du co-récepteur CD14 (Cluster de Différenciation 14). Grâce à l'action d'une lipase produite par les cellules de Kupffer, le LPS va pouvoir être inactivé et capté par les hépatocytes sans déclencher la production de cytokines inflammatoires¹⁰⁰⁻¹⁰². Par la suite, les hépatocytes vont éliminer le LPS inactivé par les voies biliaires¹⁰³. Dans cette étude, les auteurs

ont montré que du LPS-FITC (LPS couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine et détectable par spectrophotométrie) injecté dans la veine porte se retrouvait rapidement dans la vésicule biliaire et était sécrété avec la bile dans l'intestin. Cet exemple met en lumière le rôle majeur du foie dans la prise en charge des composés bactériens issus du microbiote. Une étude récente a d'ailleurs décrit le foie comme un véritable « pare-feu » s'opposant au passage du microbiote dans la circulation systémique en cas de rupture de la barrière intestinale¹⁰⁴. Nous avons vu dans la partie précédente que pour se retrouver dans la circulation sanguine, les bactéries intestinales devaient franchir la couche de mucus, échapper aux peptides antimicrobiens et aux IgA, traverser l'épithélium et déjouer la vigilance du système immunitaire. En condition physiologique, ce passage semble impossible et le foie des souris saines est considéré comme stérile¹⁰⁴. Néanmoins, dans cette étude, l'augmentation de la perméabilité intestinale (induite ici par un détergent) facilite le passage des bactéries de l'intestin vers le foie. Dans ces conditions, le foie est donc le dernier rempart capable de s'opposer à la dissémination des bactéries intestinales dans la circulation systémique¹⁰⁴.

Le rôle de « pare-feu » exercé par le foie n'est pas sans conséquences et peut déboucher sur certaines maladies hépatiques comme la stéatohépatite non alcoolique. Cette maladie est caractérisée par l'accumulation de triglycérides dans le foie associée à une inflammation. Plusieurs études ont mis en évidence des altérations de la perméabilité intestinale au cours de cette maladie¹⁰⁵. Cette augmentation de perméabilité peut entraîner une augmentation du passage du LPS dans le sang qui dépasse les capacités d'élimination des cellules de Kupffer et entraîne une inflammation hépatique. Un article publié très récemment illustre bien ce phénomène. En effet, K. Rahman *et al.* ont généré des souris invalidées pour la protéine JAM-A, une protéine impliquée dans la cohésion des jonctions serrées (**cf Introduction I-D-1)-b**)¹⁰⁶. Par la suite, les auteurs ont nourri ces souris invalidées avec un régime hyperlipidique riche en fructose et cholestérol connu pour induire une stéatohépatite non alcoolique. Il auteurs ont constaté que les souris invalidées pour JAM-A développaient une stéatose et une inflammation hépatique bien plus sévère que les souris sauvages¹⁰⁶. Ce phénotype a été associé à une augmentation d'un facteur deux de la perméabilité intestinale paracellulaire et des taux sanguins de LPS chez les souris invalidées. De manière intéressante, les auteurs ont pu prévenir l'inflammation hépatique et la stéatose chez ces souris en les traitant avec des antibiotiques ou avec un séquestrant des LPS. En conclusion, l'augmentation de la perméabilité intestinale paracellulaire (due dans cette étude à l'invalidation du gène codant pour JAM-A) induit un passage accru de LPS dans le sang et promeut le développement de la stéatohépatite non alcoolique¹⁰⁶.

Par ailleurs, le microbiote a été identifié comme étant capable de modifier la physiologie hépatique sans induire de modulation de l'inflammation. En effet, T. Le Roy *et al.*, ont montré que la colonisation des souris axéniques par le microbiote provenant de souris atteintes de stéatose hépatique était capable d'induire la stéatose chez les souris transplantées¹⁰⁷. A l'inverse, les souris transplantées avec un microbiote de souris non malades ne développaient pas de stéatose. De manière surprenante les auteurs n'ont pas constaté d'inflammation hépatique chez les souris transplantées ayant développé la maladie. Ces résultats suggèrent que le microbiote de souris atteintes de stéatose est en partie responsable de la maladie indépendamment de sa capacité à induire de l'inflammation. Cet article met en évidence que la communication entre le microbiote et le foie peut se faire en l'absence de l'activation du système immunitaire.

Au-delà de la composante inflammatoire du microbiote, certains métabolites produits par les bactéries peuvent directement impacter le foie. Yoshimoto S. *et al.*, ont montré que le microbiote intestinal pouvait produire des composés impliqués dans le développement du cancer du foie¹⁰⁸. En effet, les auteurs ont nourri des souris avec un régime hyperlipidique entraînant la production d'acide désoxycholique par le microbiote. Cette molécule est connue pour causer des dommages à l'ADN. Elle est capable, *via* la veine porte, de rejoindre le foie et d'y promouvoir l'apparition de tumeurs hépatiques chez des souris préalablement traitées avec un agent chimique mutagène. La déplétion du microbiote intestinal par un traitement antibiotique diminue la production d'acide désoxycholique et réduit l'apparition des tumeurs chez ces souris. **De manière plus générale, la plupart des métabolites hydrosolubles produits par le microbiote intestinal devra passer au contact du foie avant de rejoindre la circulation systémique.**

En plus de sa fonction de filtre, le foie joue un rôle extrêmement important dans la digestion et l'absorption des lipides. En effet, le foie produit les acides biliaires qui permettent l'émulsion des lipides contenus dans le bol alimentaire. De manière schématique, les acides biliaires déversés dans l'intestin sont appelés acides biliaires primaires. Ces acides biliaires sont majoritairement réabsorbés dans l'iléon et retournent *via* la veine porte dans le foie. Néanmoins, une fraction minoritaire chemine jusque dans le côlon et est éliminée dans les fèces. Le microbiote est alors capable de modifier la structure des acides biliaires par des phénomènes de déconjugaison et de déshydrogénation¹⁰⁹. Cette transformation bactérienne convertit les acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires. Les acides biliaires secondaires produits sont capables de moduler le métabolisme hépatique et d'inhiber la synthèse d'acides biliaires primaires par le foie¹¹⁰. Ces données démontrent que la communication entre microbiote et le foie peut se faire *via* des modifications du stock d'acides biliaires.

II- L'homéostasie glucidique une question de survie

L'homéostasie est la capacité d'un système à conserver son équilibre en dépit des contraintes du milieu extérieur. Dans l'organisme, plusieurs paramètres comme la température corporelle, la pression sanguine ou la glycémie sont maintenus constants ou oscillent autour d'une valeur référence. La glycémie correspond à la quantité de glucose présente dans le sang. L'homéostasie glucidique est donc l'ensemble des paramètres qui tendent à maintenir la glycémie autour de 1 g/l chez l'Homme et la souris. Le maintien de la glycémie est une nécessité vitale pour l'organisme. Certaines cellules comme les neurones dépendent du glucose pour fonctionner et par conséquent lors d'une hypoglycémie, le défaut d'approvisionnement du cerveau en glucose peut être mortel. A l'inverse, l'hyperglycémie prolongée a pour principale conséquence d'endommager les capillaires sanguins de certains organes comme le rein ou les yeux et de conduire à une insuffisance rénale ou la cécité.

Le maintien constant de la glycémie implique un équilibre subtil entre l'entrée et la sortie du glucose du sang. De manière schématique, le glucose sanguin a 2 origines. Au cours d'un repas, l'absorption intestinale du glucose contenu dans le bol alimentaire induit une entrée massive de glucose dans le sang. A l'inverse, en période de jeûne certains organes comme le foie et dans une moindre mesure le rein et l'intestin vont pouvoir produire du glucose afin d'éviter l'hypoglycémie. Le glucose sanguin peut être consommé par l'ensemble des organes, c'est la source d'énergie principale des cellules. Le glucose excédentaire va être stocké dans le foie et les muscles sous forme de glycogène et dans le tissu adipeux sous forme de lipides (**Figure 9**).

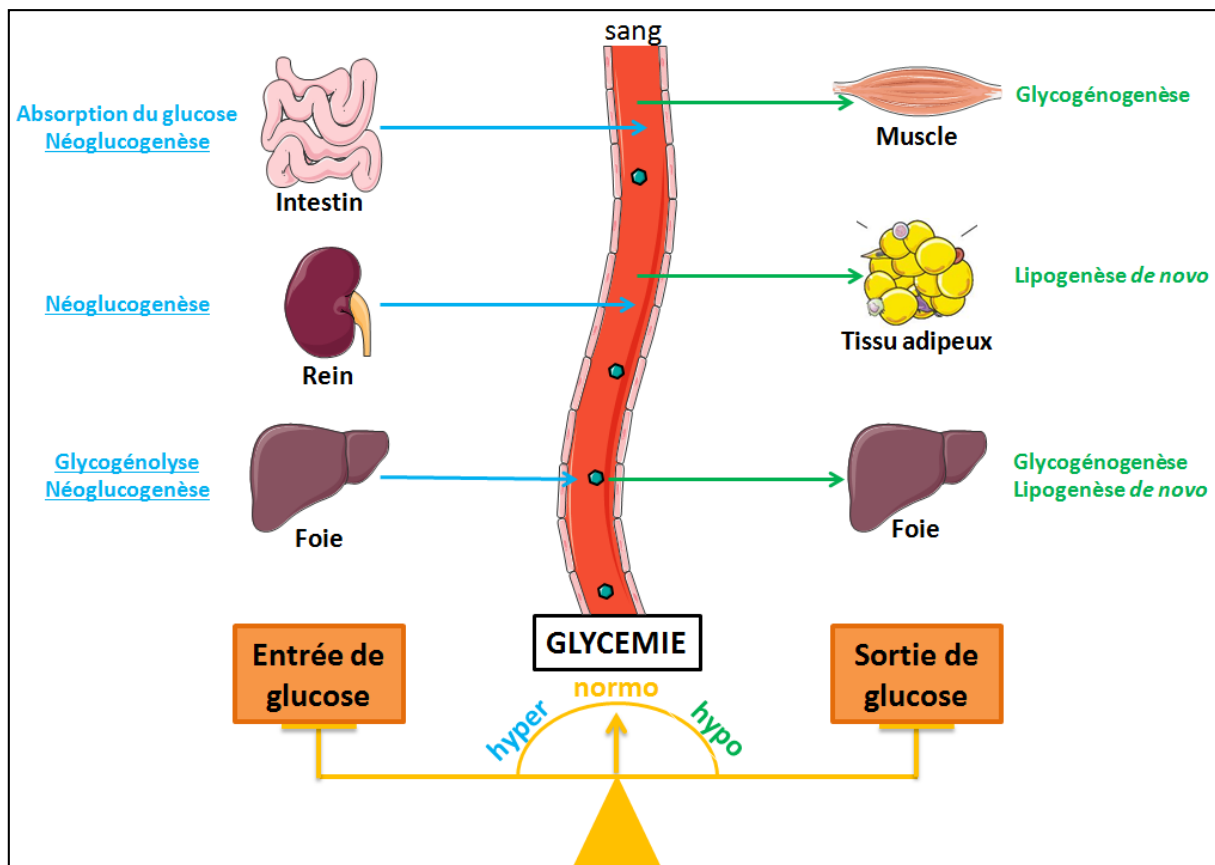


Figure 9: Les organes impliqués dans la régulation de la glycémie.

Les voies métaboliques soulignées sont mises en jeu au cours du jeûne.

En condition physiologique, l'organisme maintient une glycémie constante à une valeur proche de 1 g/L. Il existe donc un équilibre dynamique entre l'entrée et la sortie du glucose du sang. En période postprandiale, l'entrée du glucose dans le sang provient du bol alimentaire et s'effectue au niveau de l'intestin. Les organes vont alors utiliser et stocker le glucose excédentaire sous forme de glycogène dans le foie et le muscle. Si l'absorption intestinale de glucose dépasse les capacités de stockage sous forme de glycogène celui-ci est alors converti en lipides par le foie et le tissu adipeux, puis stocké sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux.

Les molécules de glucose sont représentées sous forme d'hexagones verts.

La coordination de tous ces processus biologiques est principalement assurée par la sécrétion adéquate des hormones pancréatiques : l'insuline et le glucagon. L'insuline est sécrétée par les cellules β du pancréas en réponse à l'augmentation du glucose dans le sang. Elle permet l'entrée du glucose dans les tissu insulinosensibles (comme le muscle et le tissu adipeux) tout en inhibant la production endogène de glucose par le foie. Cette hormone est donc sécrétée en réponse à l'arrivée d'un bol alimentaire. A l'inverse, le glucagon est une hormone hyperglycémiant sécrétée par les cellules α du pancréas en période de jeûne lorsque que la glycémie diminue et s'éloigne de la valeur de référence d'1 g/L. Les actions du glucagon sont globalement opposées à celle de l'insuline.

A. La régulation de la glycémie au cours du temps

1) L'arrivée du glucose contenu dans le bol alimentaire

a. L'absorption intestinale de glucose

Le glucose est rarement présent sous forme de monomère dans le bol alimentaire. Celui-ci est essentiellement structuré en glucides complexes comme l'amidon, ou sous forme de disaccharides comme le lactose ou le saccharose. Pour être absorbés par l'intestin, ces polymères vont devoir être digérés par un ensemble d'enzymes contenues dans la salive, les sucs pancréatiques et intestinaux. Ces enzymes ne sont pas capables de cliver l'ensemble des polysaccharides. C'est le cas des fibres alimentaires qui échappent à la digestion enzymatique dans l'intestin grêle et arrivent intactes dans le côlon.

Une fois sous forme de monomère, le glucose va pouvoir être absorbé dans les parties hautes de l'intestin grêle et rejoindre la circulation sanguine. L'absorption intestinale de glucose va mettre en jeu deux transporteurs au niveau des entérocytes : SGLT1 (pour Sodium-Glucose Linked Transporteur 1) et GLUT2 (pour GLUcose Tranporter 2). SGLT1 est un co-transporteur sodium/glucose situé au pôle apical des entérocytes. L'entrée du glucose dans la cellule est donc permise grâce au gradient de concentration du sodium. L'augmentation de la concentration intracellulaire en glucose va permettre son expulsion du côté baso-latéral de l'épithélium par le transporteur GLUT2. Cette vision schématique de l'absorption intestinale du glucose s'est complexifiée suite à plusieurs travaux. En effet, des souris invalidées pour GLUT2 n'ont pas de défaut majeur de l'absorption du glucose suggérant une autre voie de sortie du glucose de l'entérocyte¹¹¹. Dans cet article les auteurs ont montré que le glucose pouvait être libéré de l'entérocyte *via* un trafic vésiculaire¹¹¹. Par ailleurs, plusieurs autres travaux font état de la présence du transporteur GLUT2 au niveau de la membrane apicale des entérocytes. Celui-ci pourrait donc participer à l'entrée du glucose dans les cellules épithéliales¹¹². De plus, d'autres articles scientifiques révèlent qu'une absorption paracellulaire de glucose est possible (entre les jonctions serrées). En effet, comme vu précédemment, les jonctions serrées sont des structures dynamiques et l'entrée du glucose dans l'entérocyte est capable d'induire une ouverture des espaces para-cellulaires⁷⁷. Dans ce cas, l'augmentation de perméabilité para-cellulaire induite par le glucose semble favoriser son propre passage entre les entérocytes de l'intestin grêle⁷⁷.

De manière générale, l'absorption du glucose par l'intestin est un phénomène crucial qui va faire intervenir plusieurs mécanismes complémentaires et redondants. L'intestin grêle va pouvoir absorber le glucose très efficacement et l'arrivée massive de glucose dans le sang va entraîner une hyperglycémie postprandiale.

b. L'intestin : bien plus qu'un «sac absorbif»

Au delà de son rôle purement absorbif, l'intestin informe le reste de l'organisme de l'arrivée des aliments. Le tractus digestif perçoit en premier le contenu du bol alimentaire, c'est donc à ce niveau que les nutriments et le glucose sont détectés en premier. En effet, les cellules entéroendocrines vont pouvoir sécréter des hormones gastro-intestinales en réponse à l'entrée

du glucose dans leur cytoplasme. C'est le cas des cellules L qui sécrètent du GLP-1 et des cellules K produisant du GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide ou glucose-dependent insulinotropic peptide). Le GLP-1 et le GIP vont stimuler la libération d'insuline en passant dans le sang et en agissant directement sur le pancréas. Ces hormones peuvent également être détectées au niveau des terminaisons nerveuses du nerf vague situées dans la muqueuse intestinale et dans la paroi de la veine porte¹¹³. Cette détection vagale va informer le cerveau, et plus précisément l'hypothalamus, de l'arrivée du glucose. En réponse à ce message nerveux afférent, le cerveau va pouvoir induire la sécrétion d'insuline par le pancréas et ainsi permettre l'entrée du glucose dans les tissus insulinosensibles comme le muscle squelettique ou le tissu adipeux. De plus, la sécrétion de ces hormones gastro-intestinales va également induire une diminution de la vidange gastrique permettant l'arrivée progressive des nutriments dans l'intestin grêle. Cette arrivée progressive va empêcher l'absorption trop rapide du glucose permettant ainsi une meilleure gestion de la glycémie. Enfin, ces deux hormones exercent un effet satiétogène permettant l'arrêt de la prise alimentaire.

Le glucose n'est pas le seul nutriment capable d'induire la sécrétion d'hormones intestinales pour contrôler l'homéostasie glucidique. Par exemple, la détection de lipides par l'intestin va pouvoir induire une diminution de la production endogène de glucose par le foie. L'entrée d'acides gras dans l'entérocyte va induire la sécrétion de CCK (CholeCystoKinine) une hormone gastro-intestinale. La CCK est connue pour induire la sécrétion de suc pancréatique et de bile favorisant la digestion. Par ailleurs, plusieurs articles publiés par l'équipe de T. K. Lam ont montré que la production de CCK par l'intestin pouvait également stimuler le nerf vague et induire une diminution de la production de glucose par le foie¹¹⁴⁻¹¹⁶. Dans ces études, la perte de communication entre l'intestin et le cerveau par vagotomie (dénervation du nerf vague assurant la communication nerveuse entre l'intestin et le cerveau) entraîne une perte de l'effet inhibiteur la CCK sur la production hépatique de glucose.

La détection des nutriments par l'intestin joue un rôle central dans l'homéostasie glucidique. La détection entérique des nutriments va informer le cerveau de l'arrivée du bol alimentaire. En conséquence, le cerveau envoie des signaux qui inhibent la production endogène de glucose par le foie, favorisent la sécrétion d'insuline par le pancréas et stimulent l'entrée du glucose dans le muscle et le tissu adipeux. L'importance de la communication nerveuse entre l'intestin et le cerveau a pu être mise en évidence chez des patients ayant subi une vagotomie et soumis à un test de tolérance au glucose. La mesure de la tolérance orale au glucose est une manière simple de rendre compte de l'homéostasie glucidique. Un bolus de glucose est administré oralement aux patients de telle sorte à induire une forte hyperglycémie. La glycémie du patient est ensuite mesurée à intervalles de temps réguliers et plus elle diminue rapidement après l'administration du glucose plus le patient est tolérant au glucose. À l'inverse, si l'organisme n'élimine pas efficacement le glucose sanguin, l'homéostasie glucidique du patient est altérée et celui-ci est considéré comme intolérant au glucose. Chez les patients ayant subi une vagotomie, il est constaté une baisse d'efficacité dans la gestion de l'hyperglycémie induite lors d'un test oral de tolérance au glucose ¹¹⁷. Ces résultats mettent en lumière le rôle important de la communication entre l'intestin et le cerveau dans le contrôle de la glycémie.

2) Gestion de l'hyperglycémie postprandiale

L'augmentation de la glycémie suite à un repas va pouvoir être perçue directement par les cellules β du pancréas. L'entrée du glucose dans les cellules β va provoquer la dépolarisation de la membrane plasmique et l'exocytose des vésicules contenant l'insuline. Ce processus de sécrétion est rapide et l'insuline est libérée dans les minutes qui suivent l'absorption intestinale du glucose. Comme nous l'avons vu précédemment, la libération d'insuline par le pancréas peut être potentialisée par l'action du GLP-1 et du GIP. L'insuline est l'hormone clef de la régulation glycémique puisqu'elle est capable d'augmenter l'entrée du glucose dans le muscle squelettique et le tissu adipeux et d'inhiber la production de glucose par le foie.

a. La captation du glucose par les cellules de l'organisme

Il existe plusieurs transporteurs permettant l'entrée du glucose dans les cellules. Nous avons vu précédemment que dans l'intestin, les transporteurs GLUT2 et SGLT1 assuraient le passage du glucose de part et d'autre de la membrane plasmique. De manière schématique, les transporteurs SGLTs vont permettre le passage actif du glucose à travers la membrane plasmique contre son gradient de concentration et les transporteurs GLUTs permettent la diffusion facilitée du glucose selon son gradient de concentration. La diversité de la famille des GLUTs est importante afin de répondre aux besoins spécifiques en glucose des différents tissus. Sans entrer dans les détails, GLUT1 est présent sur la plupart des types cellulaires et il assure le transport basal du glucose. Ce transporteur est lent et facilement saturable. GLUT2 est exprimé dans l'intestin, dans le foie et dans le pancréas. Il permet un transport rapide du glucose dans ces cellules et il est difficilement saturable. Cette propriété lui permet de transporter le glucose proportionnellement à sa concentration extracellulaire. Le dernier transporteur que nous évoquerons ici est le transporteur GLUT4. Ce transporteur est exprimé majoritairement dans les tissus sensibles à l'insuline et il possède une forte affinité pour le glucose. **En présence d'insuline, GLUT4 est transporté jusqu'à la membrane plasmique des cellules insulino-sensibles et il permet d'augmenter d'un facteur 15 à 20 l'entrée du glucose dans le muscle et le tissu adipeux¹¹⁸.**

Lors de l'établissement de l'hyperglycémie postprandiale l'ensemble de ces transporteurs va être sollicité pour acheminer efficacement le glucose du milieu extracellulaire vers le cytoplasme des cellules. Le glucose va pouvoir rentrer dans la plupart des types cellulaires *via* le transporteur GLUT1. Il va également rentrer dans le foie et le pancréas grâce à GLUT2. Le pancréas va alors produire de l'insuline en réponse à l'entrée du glucose dans les cellules β . L'insuline ainsi produite va permettre la translocation du récepteur GLUT4 à la membrane des cellules musculaires et adipocytaires qui vont pouvoir capter massivement du glucose. L'ensemble de ces facteurs va aboutir à la baisse de la glycémie.

Une fois entré dans les cellules, le glucose est immédiatement phosphorylé et converti en glucose-6-phosphate par une hexokinase. Ce processus s'effectue dans tous les types cellulaires et va permettre la séquestration du glucose dans le cytoplasme des cellules. En effet les transporteurs GLUTs fonctionnent selon le gradient de concentration du glucose établi de part et d'autre de la membrane plasmique des cellules. Si le glucose n'est pas phosphorylé par une

hexokinase dès son entrée dans la cellule, la concentration intracellulaire du glucose va inévitablement augmenter. Par conséquent, si le glucose se retrouve plus concentré à l'intérieur du cytoplasme que dans le milieu extracellulaire celui-ci va pouvoir être pris en charge par les transporteurs GLUTs dans l'autre sens et ainsi sortir de la cellule.

b. Le devenir biochimique du glucose intracellulaire

Par la suite, en fonction du type cellulaire et de l'état métabolique de la cellule, le glucose-6-phosphate a 4 devenir possibles (**Figure 10**):

- La cellule a besoin d'énergie et le glucose est **hydrolysé pour produire de l'ATP et du NADH** : cette voie métabolique peut se décomposer en 2 parties : la glycolyse (qui a lieu dans le cytoplasme) et le cycle de Krebs (qui se déroule dans la mitochondrie).

- L'entrée de glucose dans la cellule est supérieure à ses besoins énergétiques et celui-ci est **stocké sous forme de glycogène**. La glycogénogenèse n'est pas effectuée dans tous les organes mais essentiellement dans les muscles et le foie.

- La cellule n'a pas besoin d'énergie et le glucose-6-phosphate est **converti en acide gras lors du processus de lipogenèse de novo**. La lipogenèse *de novo* ne s'effectue que dans le foie ou dans le tissu adipeux. Les acides gras néo-formés sont alors stockés sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux. Lors de certaines pathologies métaboliques, comme l'obésité ou la stéatose hépatique, le stockage de ces lipides peut avoir lieu dans le foie et même dans d'autres organes, comme le muscle squelettique. On parle alors de dépôt ectopique de lipides, ce qui définit la lipotoxicité.

- Enfin, le glucose-6-phosphate peut également **rentrer dans la voie anabolique des pentoses phosphates afin de générer du ribose-5-phosphate** (nécessaire à la synthèse de nucléotides) **et du NADPH** (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate + H^+ , composé indispensable aux réactions réductrices de biosynthèses).

Chacune de ces voies métaboliques comprend des dizaines de réactions enzymatiques plus ou moins complexes nécessitant ou non de l'énergie pour s'effectuer. Dans ce chapitre je décrirai uniquement la glycolyse et la glycogénogenèse.

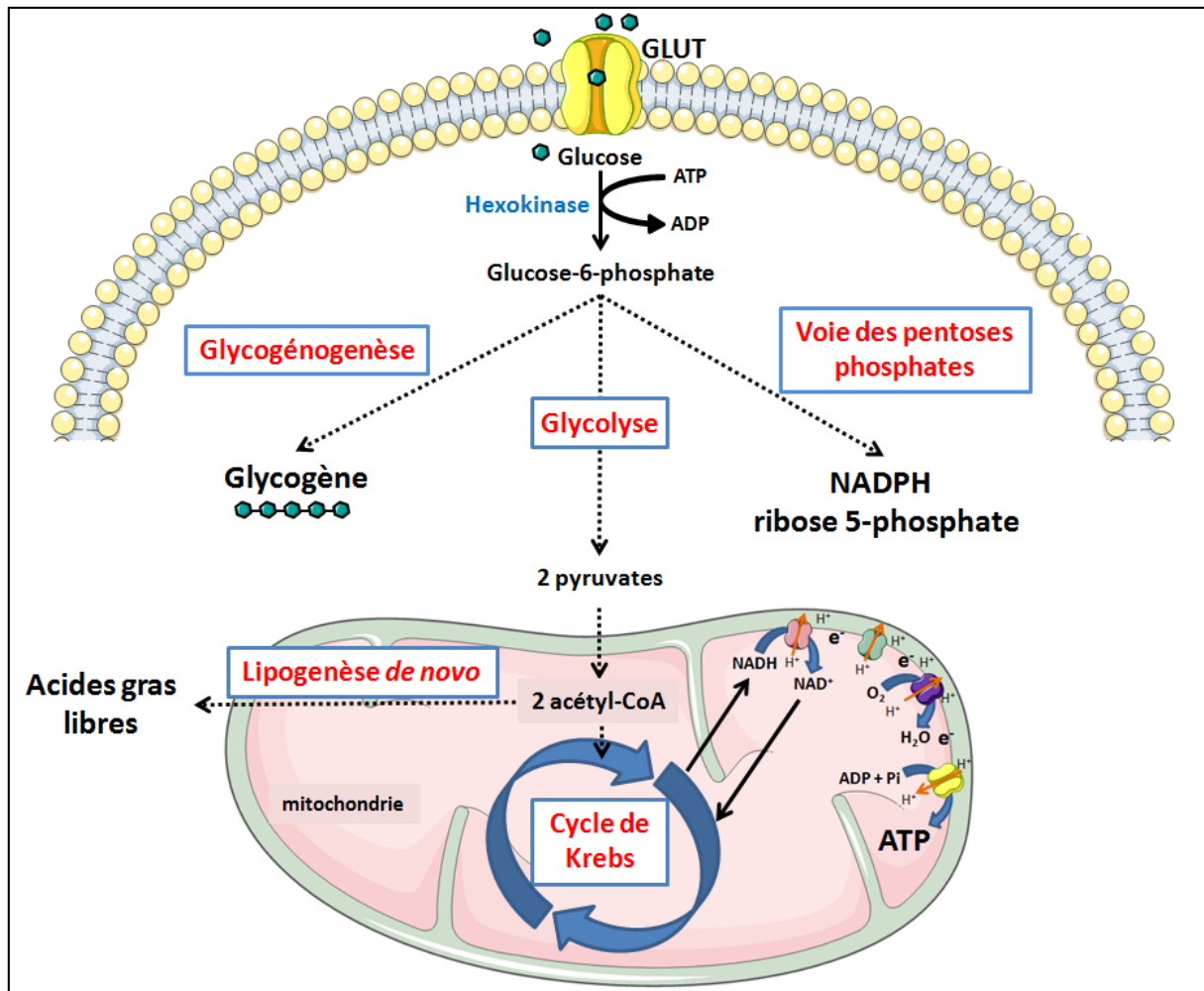


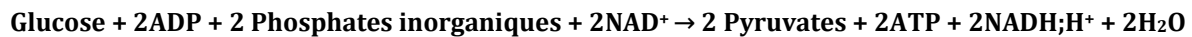
Figure 10: Les quatre devenir possibles du glucose intracellulaire.

Lors de son entrée dans la cellule le glucose est immédiatement phosphorylé en glucose-6-phosphate par une hexokinase. Ensuite en fonction de l'état énergétique de la cellule, celui-ci peut emprunter 4 voies métaboliques : la glycogénogenèse, la glycolyse, la voie des pentoses phosphates ou la voie de la lipogenèse *de novo*.

Il est important de rappeler que dans l'organisme, il existe 2 grands types de réactions biochimiques. Les réactions endergoniques qui ne sont pas spontanées et qui ont besoin d'un apport d'énergie pour s'effectuer et les réactions dites exergoniques qui sont spontanées et qui libèrent de l'énergie. De ce fait, pour qu'une réaction endergonique ait lieu il faut qu'elle soit couplée à une réaction exergonique. Dans l'organisme, la grande majorité des réactions endergoniques est couplée à l'hydrolyse de l'ATP (Adénosine TriPhosphate) en ADP (Adénosine DiPhosphate). **L'ATP constitue donc la principale source d'énergie chimique intracellulaire et son hydrolyse va fournir l'énergie nécessaire pour beaucoup de réactions endergoniques.** Ainsi, l'ATP est continuellement consommé et régénéré et l'équilibre entre ATP et ADP est très dynamique. Dans les cellules, la reconversion de l'ADP en ATP a plusieurs origines : la glycolyse qui converti 2 molécules d'ADP en 2 molécules d'ATP par glucose hydrolysé, le cycle de Krebs qui produit 1 molécule d'ATP lors de la conversion du succinil-CoA en succinate et la chaîne respiratoire mitochondriale qui assure l'essentiel de la production d'ATP en présence d'oxygène.

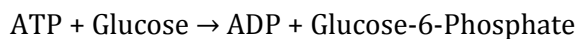
i) L'oxydation du glucose à des fins énergétiques

Comme nous l'avons vu précédemment l'oxydation du glucose va avoir pour but de produire de l'ATP. Après, sa conversion en glucose-6-phosphate le glucose va subir 9 réactions biochimiques aboutissant à la formation de 2 molécules de pyruvate et de 2 molécules d'ATP. Ce processus est appelé glycolyse et il a pour équation bilan :

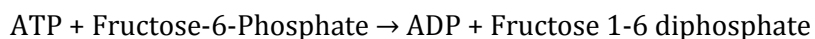


Chacune des réactions biochimiques est catalysée par une enzyme spécifique. (*Nota bene* : une enzyme ne peut pas rendre possible une réaction endergonique, elle catalyse seulement des réactions thermodynamiquement favorables). Parmi les 10 réactions nécessaires à la glycolyse 3 sont irréversibles *in vivo* car elles sont fortement exergoniques (**Figure 11**):

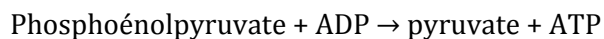
- **La phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate** est la première réaction de la glycolyse. Comme nous l'avons vu précédemment elle est commune à l'ensemble des voies biochimiques impliquant le glucose. Cette réaction est catalysée par l'hexokinase et consomme une molécule d'ATP.



- **La phosphorylation du fructose-6-phosphate en fructose-1,6-diphosphate** est la troisième étape de la glycolyse catalysée par l'enzyme phosphofructokinase 1. Comme la précédente, cette réaction est irréversible et nécessite de l'ATP.



- **La conversion du phosphoénolpyruvate en pyruvate** est la dernière réaction de la glycolyse. Cette réaction est fortement exergonique et libère suffisamment d'énergie pour permettre la formation d'ATP. En condition physiologique la réaction inverse est donc impossible.



Les autres réactions de la glycolyse sont réversibles et c'est la proportion relative des différents substrats et produits, ainsi que l'état d'activation des enzymes qui dicteront le sens de réaction.

La glycolyse peut se dérouler en conditions aérobie ou anaérobie. Néanmoins, le bilan n'est pas identique. En effet, en condition aérobie une molécule de glucose peut donner 2 molécules d'ATP et 2 molécules de NADH. Le NADH formé peut alors être ré-oxdé au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale et aboutir à la production de 5-6 molécules d'ATP supplémentaires (1 NADH permet la synthèse indirecte d'environ 3 molécules d'ATP). En condition anaérobie, le NADH ne peut plus être oxydé au niveau de la mitochondrie car l'oxygène n'est pas présent pour jouer son rôle d'accepteur final d'électrons. Dans ces conditions, le NADH va permettre la réduction du pyruvate en lactate. Cette réaction est catalysée par la lactate déshydrogénase. Le lactate formé est exporté hors de la cellule par des transporteurs afin d'éviter l'acidification du cytoplasme. Le NAD⁺ obtenu lors de la formation du lactate peut alors être à nouveau réduit lors de la glycolyse d'une nouvelle molécule de glucose.

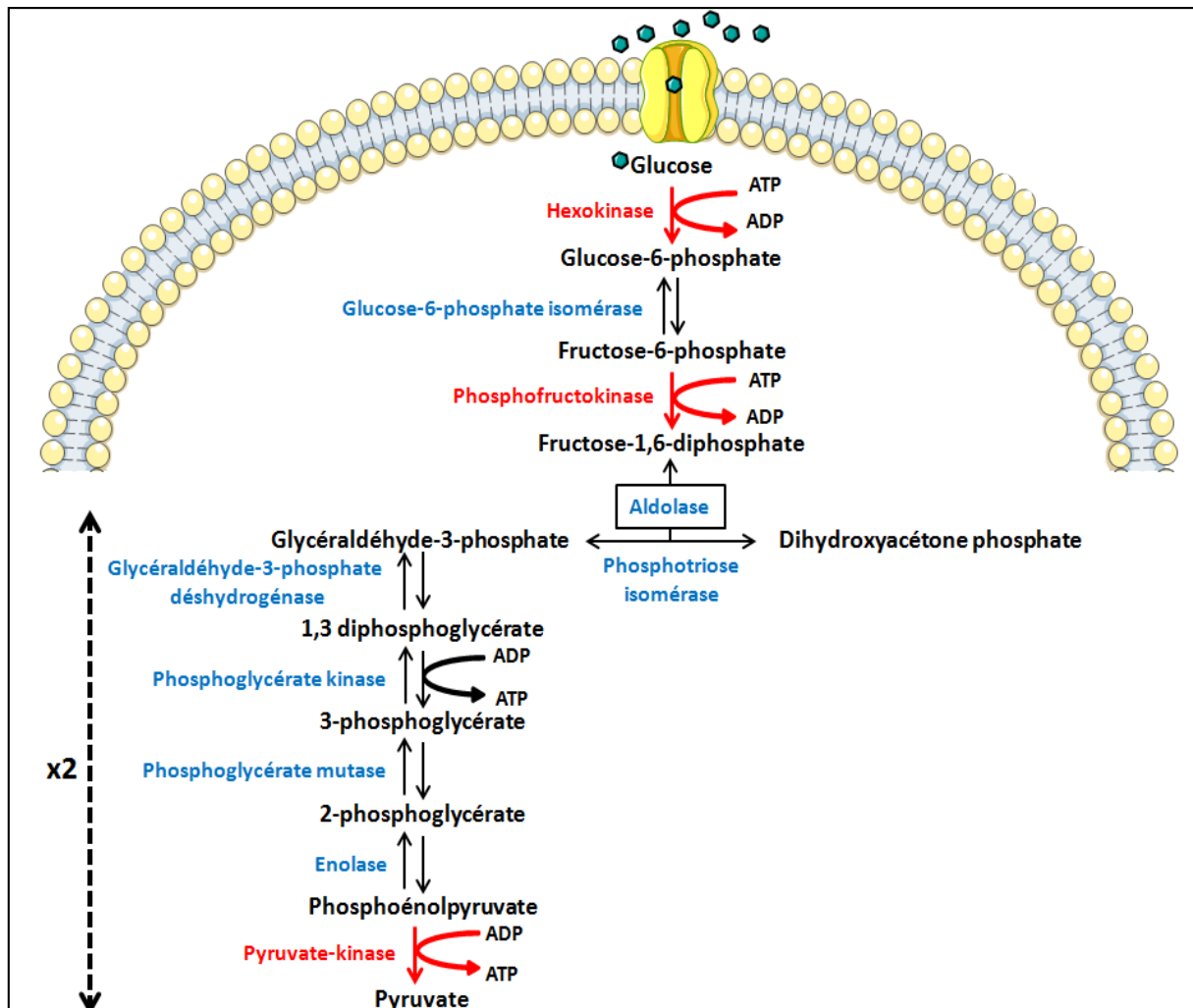


Figure 11: Schéma détaillé des réactions impliquées dans la glycolyse.

Le nom des enzymes est noté en bleu et les réactions irréversibles consommatrices d'ATP sont notées en rouge.

ii) Le stockage du glucose sous forme de glycogène

Le glycogène est la forme principale de stockage du glucose dans l'organisme. Il s'agit d'un polymère du glucose dont les molécules sont liées les unes aux autres pour former des chaînes glucidiques. Les hépatocytes et les cellules musculaires sont les seules cellules à pouvoir le stocker efficacement. Malgré le même processus de stockage dans le muscle et dans le foie, le rôle physiologique du glycogène dans ces 2 organes est complètement différent. En effet, dans le muscle, le glycogène sert uniquement de réserve énergétique pour la formation d'ATP nécessaire à la contraction musculaire. En d'autres termes, le glycogène d'un muscle donné ne peut pas être utilisé par un autre organe, même par un autre muscle. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, la conversion du glucose en glucose-6-phosphate est une réaction irréversible et le muscle ne dispose pas de l'enzyme capable d'effectuer la réaction inverse. Sans cette enzyme, la glucose-6-phosphatase, le glucose est séquestré dans le cytoplasme des cellules. A l'inverse, le stock de glycogène hépatique peut être mobilisé pour libérer du glucose dans le

sang, car le foie exprime la glucose-6-phosphatase indispensable à la formation du glucose. Ce stock participe donc activement à la régulation de l'homéostasie glucidique.

La voie de biosynthèse du glycogène fait intervenir 4 réactions successives. La dernière étape, permettant l'ajout d'un résidu glucidique au glycogène existant, est catalysée par la glycogène synthase. Cette réaction constitue le point de contrôle de la glycogénogenèse. En période postprandiale, l'insuline permet l'activation de la glycogène synthase, favorisant ainsi le stockage du glycogène et la baisse de la glycémie (**Figure 12**).

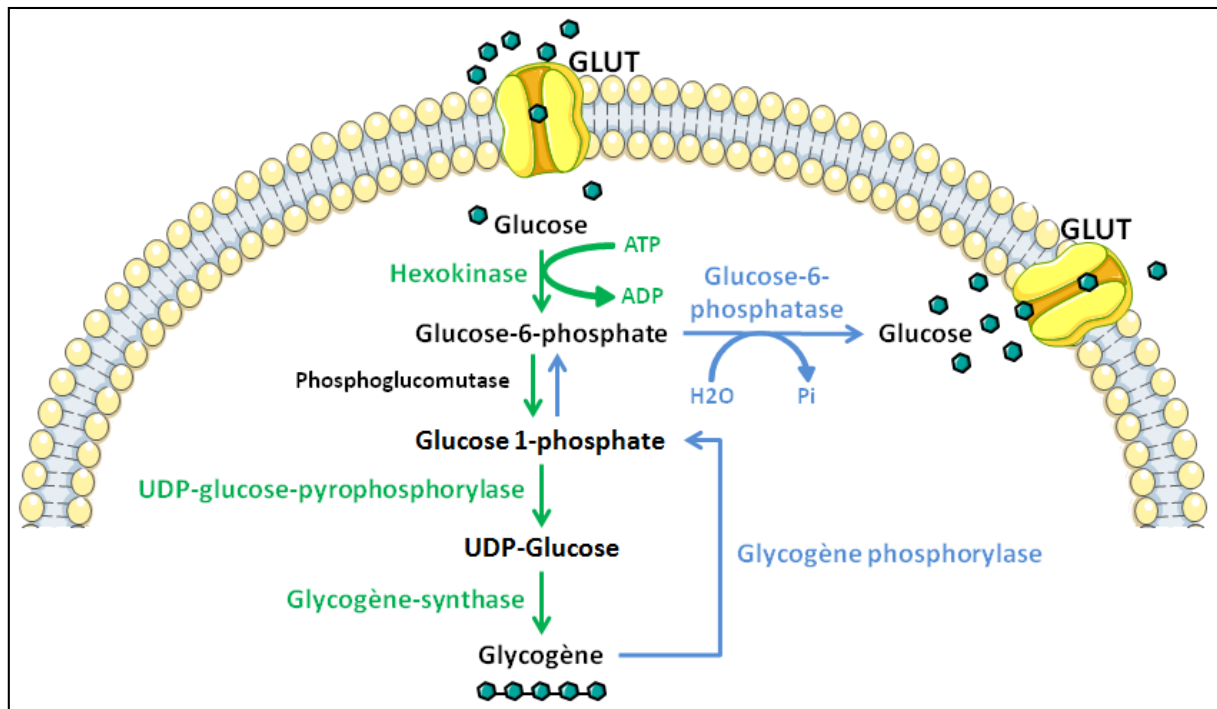


Figure 12: Voie de synthèse et d'utilisation du glycogène hépatique.

Les enzymes spécifiques de la glycogénogenèse sont représentées en vert. Les enzymes spécifiques de la glycogénolyse sont représentées en bleu.

Le foie est capable de stocker le glucose excédentaire sous forme de glycogène dans son cytoplasme : cette voie métabolique s'appelle glycogénogenèse. Lors du jeun, le glycogène est alors mobilisé et converti en glucose lors de glycogénolyse. Cette voie ne nécessite pas d'ATP et seulement 3 réactions se succèdent pour produire du glucose. Le foie peut donc rapidement relarguer du glucose à partir de ses stocks de glycogène.

3) Maintien de la glycémie à distance des repas

Nous avons vu dans le chapitre précédent que le glucose absorbé suite à un repas allait rapidement être pris en charge par l'organisme et être utilisé comme source énergétique. Le glucose excédentaire va alors être stocké sous forme de glycogène dans le muscle et le foie et sous forme de lipides par le tissu adipeux (suite à un processus de lipogenèse *de novo*). Néanmoins, l'apport alimentaire de glucose n'est pas constant et l'organisme va devoir maintenir sa glycémie lors des périodes de jeûne au cours desquelles l'absorption intestinale de glucose est nulle.

a. La glycogénolyse hépatique

Pour continuer à approvisionner l'organisme en glucose à distance des repas, le foie mobilise ses stocks de glycogène accumulés en période postprandiale. Cette voie métabolique est appelée glycogénolyse. Contrairement à ce qu'on pourrait penser ce n'est pas la voie inverse de la glycogénogenèse décrite précédemment mais bien une voie distincte. L'étape limitante de cette voie est catalysée par la glycogène phosphorylase qui clive le glycogène pour libérer un glucose-1-phosphate. Ensuite, la phosphoglucomutase converti le glucose-1-phosphate en glucose-6-phosphate. Enfin, la G6Pase (Glucose-6-Phosphatase) permet l'hydrolyse du glucose-6-phosphate en glucose qui quitte la cellule et participe au maintien de la glycémie (**Figure 12**). Le glucose ainsi produit peut alors être utilisé par les organes qui en ont besoin. Le stock de glycogène n'est néanmoins pas illimité et d'autres mécanismes vont devoir se mettre en place pour maintenir la glycémie lors d'un jeûne plus long.

b. La néoglucogenèse

Lorsque les stocks de glycogène sont consommés, le foie, le rein et l'intestin vont pouvoir convertir des composés non glucidiques en glucose pour maintenir la glycémie. Cette voie métabolique est appelée néoglucogenèse. Lors d'un jeûne court (5 heures chez le rat) la majorité du glucose néo-formé provient du foie et c'est lorsque le jeûne se prolonge (supérieur à 24 heures) que le rein et l'intestin contribuent au maintien de la glycémie¹¹⁹. Les travaux de G. Mithieux ont permis de quantifier la contribution relative de ces différents organes au maintien de la glycémie au cours du jeun¹¹⁹. Chez le rat, après 5 heures de jeun, le foie est responsable de près de 80% de la production de glucose et les 15-20% restants sont principalement assurés par les reins. Lors d'un jeûne prolongé (supérieur à 24h), la production rénale et intestinale de glucose sont fortement augmentées pour atteindre environ 50% et 20% de la production totale de glucose respectivement. Dans nos sociétés modernes, où la nourriture est riche en sucres et les repas sont fréquents, la néoglucogenèse est principalement mise en jeu au réveil. Néanmoins, elle joue un rôle crucial chez le nouveau-né. En effet, lors de la gestation le fœtus reçoit un apport constant en glucose et en oxygène par sa mère. Les substrats énergétiques d'origine maternelle sont suffisants pour couvrir tous les besoins énergétiques du nouveau-né. Cependant, à la naissance, le nouveau-né devient brusquement autonome et il doit assurer seul le maintien de sa glycémie. Les réserves de glycogène hépatique accumulées lors de la vie fœtale sont consommées très rapidement dans les heures qui suivent l'accouchement. Par ailleurs, le lait maternel riche en lipides et pauvre en glucides ne permet pas un apport en glucose suffisant pour le maintien de la glycémie. Le nouveau-né est alors entièrement dépendant du processus de néoglucogenèse pour survivre. Les enzymes nécessaires à la néoglucogenèse hépatique sont absentes du foie fœtal et augmentent très rapidement dans les heures qui suivent la naissance¹²⁰. Dans cette période cruciale, un défaut de néoglucogenèse hépatique peut s'avérer mortel pour le nouveau-né. En outre, l'inactivation du gène codant pour la PEPCK (PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase), une enzyme clef de la néoglucogenèse, induit la mort prématurée des souriceaux dans les jours qui suivent l'accouchement¹²¹.

Les principaux substrats utilisés lors de la néoglucogenèse sont : le lactate, le glycérol, les acides aminés glucoformateurs et le propionate. Ce dernier n'est pas le substrat de prédilection chez l'Homme, mais la glycémie chez certains herbivores est

entièrement conditionnée par la conversion du propionate en glucose. C'est le cas des bovins dont l'alimentation est presque entièrement dépourvue de glucose. Chez ces animaux, la fermentation des fibres alimentaires par les bactéries intestinales permet la production d'acides gras à chaîne courte comme le propionate qui sont alors convertis en glucose par la néoglucogenèse. Dans ces conditions, l'hyperglycémie postprandiale n'est pas retrouvée et la glycémie physiologique des ruminants est proche de 0,5 g/L soit 2 fois moins que celle mesurée chez l'Homme à jeun.

La néoglucogenèse et la glycolyse empruntent la même voie métabolique mais en direction opposée (**Figure 13**). Néanmoins, comme nous l'avons vu précédemment 3 réactions glycolytiques sont fortement exergoniques et irréversibles. Ces réactions vont devoir être contournées lors de la néoglucogenèse. Autrement dit, parmi les 10 réactions impliquées dans la néoglucogenèse à partir du pyruvate, 7 sont réversibles et communes à la glycolyse. Les 3 réactions restantes font intervenir des enzymes spécifiques de la néoglucogenèse et sont décrites ci-dessous.

- La conversion du pyruvate en phosphoenolpyruvate :

Cette réaction est l'inverse de la réaction glycolytique catalysée par la pyruvate carboxylase. Lors de la glycolyse, cette réaction permet la production d'ATP. Par conséquent, l'hydrolyse d'une molécule d'ATP va être nécessaire pour effectuer la réaction inverse. La première étape consiste en la carboxylation du pyruvate en oxaloacétate par la pyruvate carboxylase mitochondriale. Cette réaction consomme 1 molécule d'ATP. Ensuite, la PEPCK catalyse la décarboxylation et la phosphorylation de l'oxaloacétate en phosphoenolpyruvate. Cette réaction consomme 1 molécule de GTP (Guanosine Tri-Phosphate, molécule fortement énergétique jouant un rôle similaire à l'ATP dans cette réaction). Il est important de préciser que ces 2 réactions sont indispensables au processus de néoglucogenèse hépatique à partir du pyruvate, des acides aminés et du propionate. Cependant la néoglucogenèse à partir du glycérol n'emprunte pas cette voie, il s'insère dans la voie de la glycolyse plus tard (**Figure 13**).

- La déphosphorylation du fructose-1-6-biphosphate en fructose-6-phosphate :

Cette réaction est catalysée par la fructose-1-6-biphosphatase. Cette enzyme est nécessaire lors de la conversion du pyruvate en glucose mais également lors de la conversion du glycérol en glucose.

- La conversion du glucose-6-phosphate en glucose :

Cette réaction est catalysée par la G6Pase et elle est commune à la voie de la glycogénolyse. Cette enzyme est exprimée dans tous les organes impliqués dans la production endogène de glucose. Sans elle le glucose ne peut pas quitter le cytoplasme et participer au maintien de la glycémie. Chez l'Homme la glycogénose de type 1 est une maladie caractérisée par des mutations de la glucose-6-phosphatase. Chez ces patients, l'hypoglycémie sévère observée à la naissance peut être mortelle sans une supplémentation en glucose. Ce constat confirme le rôle fondamental de la néoglucogenèse lors des premiers jours de la vie. Par ailleurs, à l'âge adulte, ces patients souffrent d'une accumulation anormale de glycogène dans le foie et dans le rein. Une forte acidose métabolique causée par une concentration excessive de lactate dans le sang est également présente. Enfin, comme attendu, des épisodes d'hypoglycémies peuvent se manifester

entre les repas. Chez la souris, la délétion de la glucose-6-phosphatase induit les mêmes symptômes et conduit à une mort prématurée¹²².

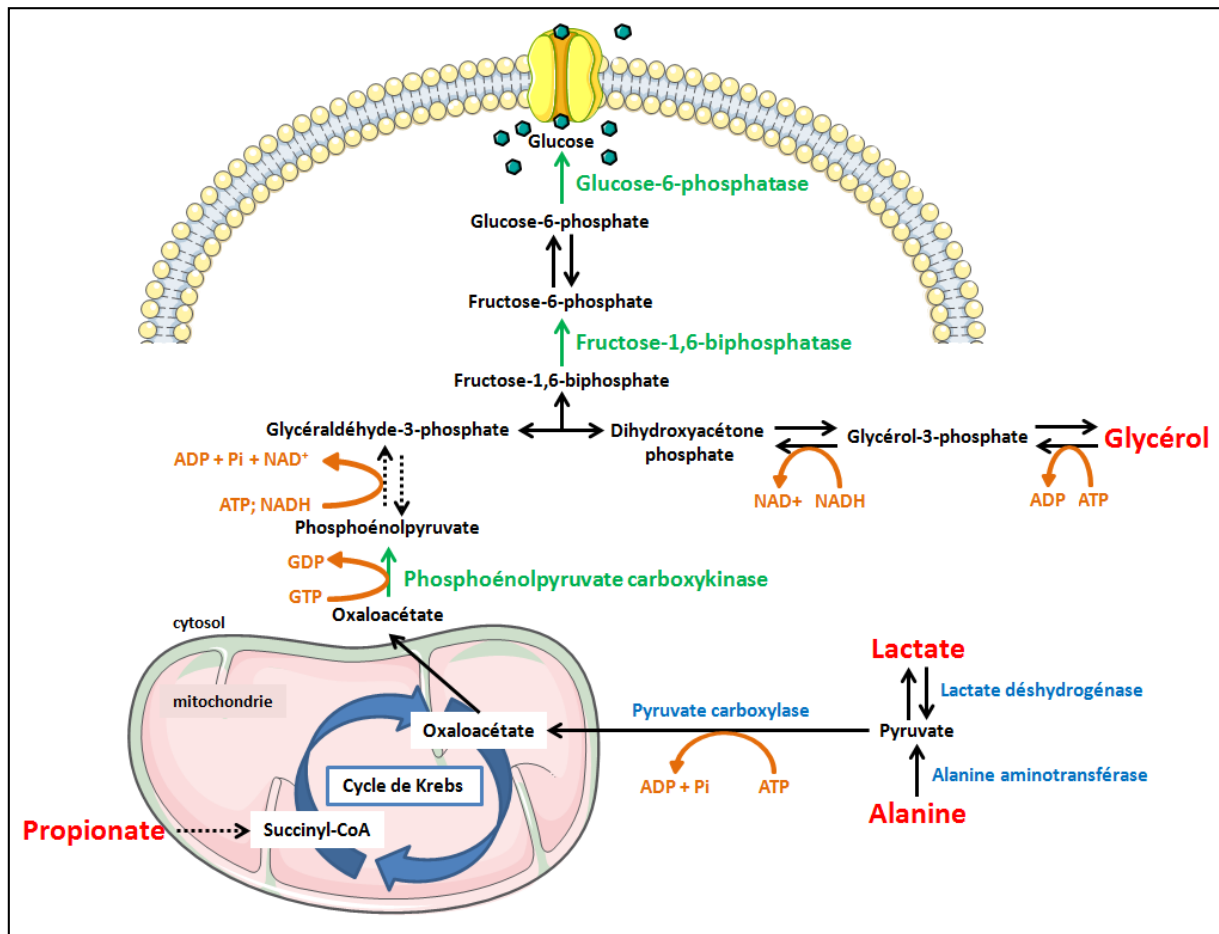


Figure 13: La néoglucogénèse hépatique.

Les précurseurs néoglucogéniques sont notés en rouge. Les réactions irréversibles sont notées en vert. Les réactions consommant de l'énergie sont représentées en orange.

La conversion de précurseurs néoglucogéniques en glucose est un processus nécessitant de l'énergie. Pour que la néoglucogénèse soit efficace, le foie doit la coupler à une voie productrice d'énergie sous forme de NADH, d'ATP et de GTP. Au cours du jeûne, les acides gras issus de la lipolyse du tissu adipeux peuvent être oxydés au niveau du foie afin de fournir l'énergie nécessaire à la néoglucogénèse.

i) Origine des précurseurs néoglucogéniques

Les précurseurs néoglucogéniques ont 4 origines possibles (**Figure 14**) :

- **Le microbiote intestinal** qui produit du propionate lors de la fermentation des glucides complexes (fibres alimentaires).
- **Le muscle** qui produit du lactate lors de la glycolyse et de l'alanine au cours du jeûne.
- **Le tissu adipeux** qui libère du glycérol lors de l'hydrolyse des triglycérides au cours du jeûne.

- **Les globules rouges** qui produisent du lactate lors de la glycolyse. En effet les hématies ne disposent pas de mitochondries et l'intégralité du glucose consommé est converti en lactate.

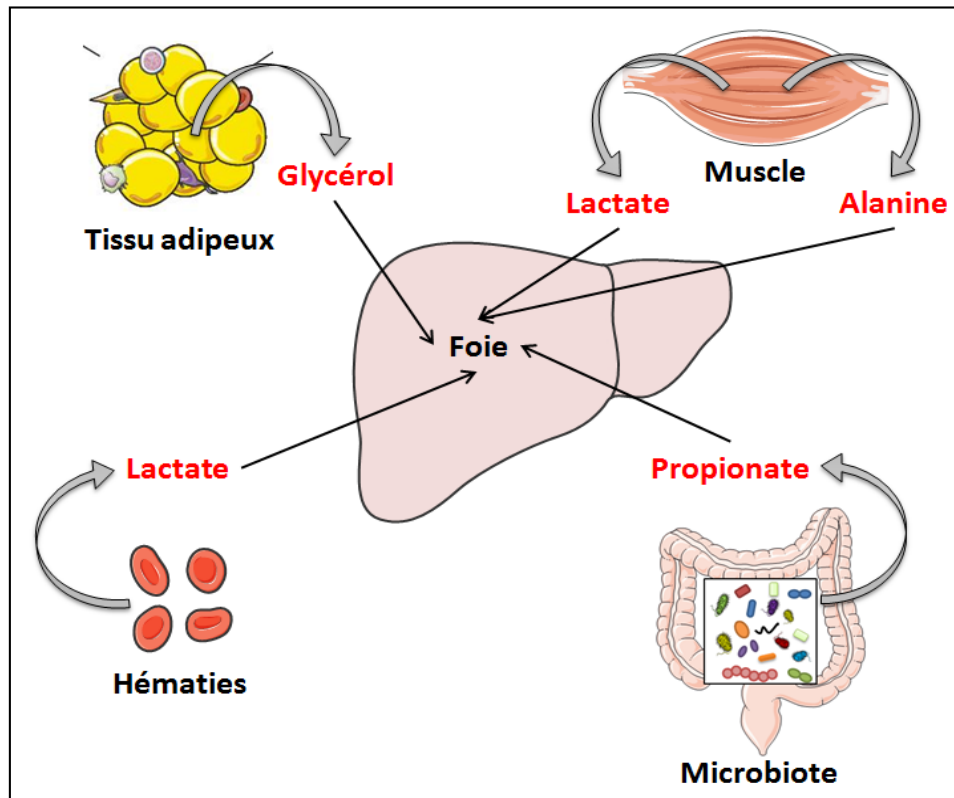


Figure 14: Origine des précurseurs néoglucogéniques.

Les précurseurs non glucidiques ont 4 origines principales dans l'organisme. Au cours du jeûne, le tissu adipeux produit du glycérol lors de la lipolyse. Au cours d'un exercice physique intense, le pyruvate va être converti en lactate ou en alanine par le muscle et libéré dans la circulation sanguine. Les hématies sont dépourvues de mitochondries et la glycolyse est la seule voie métabolique productrice d'ATP. Le pyruvate produit va alors être converti en lactate et libéré dans le sang. Enfin, le microbiote peut produire du propionate qui sera acheminé au foie et converti en glucose.

Le lactate produit par le muscle ou par les globules rouges peut être reconverti en glucose par le foie. Le glucose ainsi formé est alors à nouveau disponible pour les tissus. Ce cycle du lactate est appelé cycle de Cori. En condition de jeûne, le muscle peut également convertir le pyruvate formé lors de la glycolyse en alanine par transamination. Ce mécanisme permet d'éliminer les fonctions azotées produites dans le muscle lors du catabolisme des acides aminés. L'alanine formée est exportée vers le foie où elle peut être reconvertie en glucose. La fonction azotée est alors éliminée au niveau du foie par la formation d'urée. On parle dans ce cas de cycle glucose-alanine.

L'ensemble de ces processus est coûteux en énergie et il doit être soutenu par la production d'ATP et de NADH dans des organes néoglucogéniques. Au cours du jeûne, la libération du glycérol par le tissu adipeux va se faire de manière conjointe à celle des acides gras libres. L'oxydation de ces derniers au niveau du foie va donc permettre la production d'ATP et de NADH nécessaires à la néoglucogénèse. De manière intéressante, certains défauts de néoglucogénèse observés chez le nouveau-né ne sont pas dus à un défaut d'induction des

enzymes néoglucogéniques ni à une absence de précurseurs suffisants. Dans plusieurs cas, il est constaté un défaut d'oxydation des acides gras. Par exemple, chez des nouveaux-nés dont la carnitine palmitoyltransférase est déficiente. Cette enzyme n'est alors pas capable d'assurer l'entrée des acides gras dans la mitochondrie et il s'en suit un défaut de leur oxydation. Cela entraîne alors une hypoglycémie sévère associée à un défaut de néoglucogenèse hépatique chez ces nouveaux-nés¹²³. Les acides gras ne sont pas des précurseurs néoglucogéniques chez l'Homme ou chez la souris mais leur hydrolyse dans le foie conduit à la production d'énergie nécessaire au processus de néoglucogenèse.

ii) La régulation hormonale de la production endogène de glucose

La production endogène de glucose est finement régulée par les hormones pancréatiques. En effet, en période postprandiale, la sécrétion d'insuline en réponse à l'hyperglycémie va inhiber la production hépatique de glucose (**Figure 15**). L'insuline peut agir directement sur le foie en inhibant l'expression des enzymes clefs de la néoglucogenèse tout en activant la synthèse de glycogène. L'effet de l'insuline est en partie dépendant de l'inhibition du facteur de transcription FoxO1 (Forkhead box protein O1). Lorsqu'il est non phosphorylé, FoxO1 peut induire l'expression de la PEPCK et de la G6Pase. Après la fixation sur son récepteur, l'insuline va induire une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à la phosphorylation et à l'activation d'Akt (une protéine de signalisation intracellulaire également connue sous le nom de PKB pour Protéine Kinase B). Une fois activé, Akt va pouvoir phosphoryler le facteur de transcription FoxO1 qui va alors être exclu du noyau et dégradé. Ce mécanisme va donc s'opposer à l'expression des enzymes néoglucogéniques (**Figure 15**). En effet, l'équipe de D. Accili a pu montrer que des souris invalidées pour FoxO1 ont une diminution de la néoglucogenèse hépatique et de la glycogénolyse¹²⁴. Néanmoins, cette voie n'est pas la seule et d'autres voies de signalisation induites par l'insuline peuvent participer à la baisse d'expression des enzymes néoglucogéniques. En effet, M. Lu *et al.* ont pu démontrer qu'après la délétion d'Akt et de FoxO1 dans le foie, l'insuline était toujours capable d'induire une diminution de la production hépatique de glucose chez la souris¹²⁵. Deux autres études ont mis en évidence que l'insuline était toujours capable d'inhiber la production hépatique de glucose indépendamment de l'expression du récepteur à l'insuline sur le foie. Ces résultats suggèrent que l'insuline peut agir *via* un autre organe pour inhiber la production hépatique de glucose^{126,127}.

L'insuline peut inhiber la production hépatique de glucose de manière indirecte en réduisant l'apport au foie des substrats néoglucogéniques. En effet, l'inhibition de la lipolyse du tissu adipeux induite par l'insuline prive le foie de glycérol mais également d'acides gras libres nécessaires à la néoglucogenèse. L'hydrolyse des acides gras libres dans le foie est primordiale pour fournir l'énergie nécessaire à la néoglucogenèse¹²⁸ (**Figure 15**).

Enfin, l'insuline peut également agir sur le cerveau et inhiber la production hépatique de glucose^{129,130}. Les travaux de Obici S. *et al.* ont pu démontrer que l'insuline produite par le pancréas pouvait être perçue par l'hypothalamus et inhiber la production hépatique de glucose. Dans cette étude, l'injection d'insuline dans le troisième ventricule au contact de l'hypothalamus induit une diminution rapide de la production hépatique de glucose¹²⁹. Le troisième ventricule est une cavité cérébrale remplie de liquide céphalorachidien situé à proximité de l'hypothalamus. Par la suite, plusieurs études ont décortiqué ces mécanismes afin de déterminer

les différentes populations neuronales hypothalamiques et les voies de signalisations impliquées dans ces phénomènes^{131,132}. Par ailleurs, l'équipe de M. Kasuga a bien décrit les conséquences de l'action hypothalamique de l'insuline sur le foie. En effet, ce laboratoire a pu mettre en évidence une augmentation de la production d'IL-6 par les hépatocytes en réponse à l'action cérébrale de l'insuline¹³³. L'IL-6 ainsi produite permet la phosphorylation du facteur de transcription STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) dans le foie et d'inhiber l'expression des enzymes impliquées dans la néoglucogenèse hépatique¹³³ (**Figure 15**).

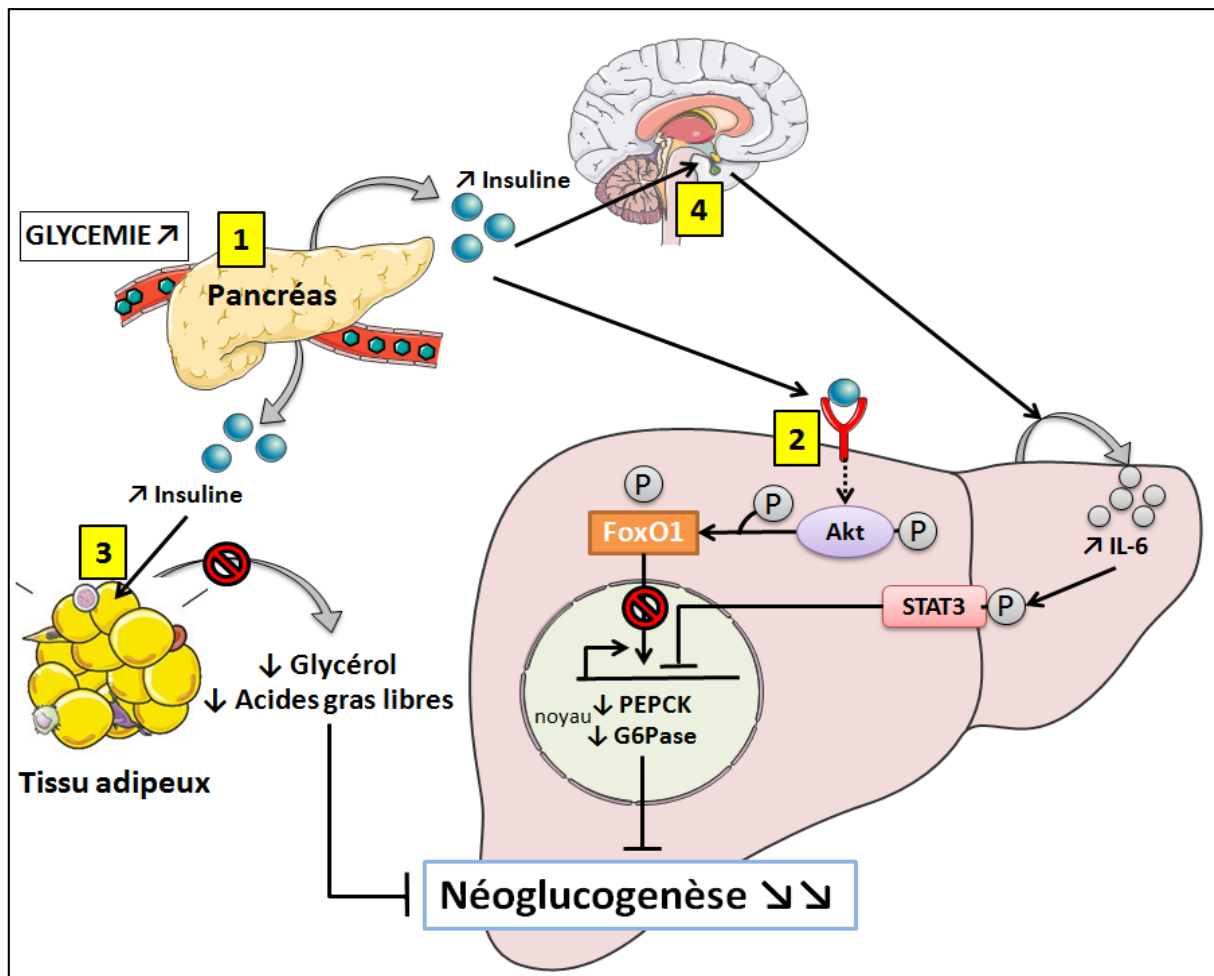


Figure 15: Régulation de la néoglucogenèse hépatique par l'insuline.

L'insuline est capable d'inhiber la néoglucogenèse hépatique par plusieurs actions complémentaires.

1- L'insuline est sécrétée par le pancréas lorsque la glycémie s'élève.

2- L'insuline peut agir directement sur le foie et induire la phosphorylation de FoxO1 un facteur de transcription capable de stimuler l'expression des enzymes clés de la néoglucogenèse PEPCK et G6Pase. FoxO1 est alors exclu du noyau, l'expression de PEPCK et G6Pase est diminuée et la néoglucogenèse est alors inhibée.

3- L'insuline peut également agir sur le tissu adipeux en bloquant la lipolyse. Ce blocage entraîne une diminution de l'approvisionnement du foie en acides gras et en glycérol. Il en résultera une baisse de la néoglucogenèse hépatique.

4- L'insuline peut également agir sur le système nerveux central et générer un message nerveux efférent en direction du foie. Les hépatocytes vont alors pouvoir sécréter de l'IL-6 qui induira la phosphorylation du facteur de transcription STAT3. STAT3 va alors entrer dans le noyau et inhiber l'expression de la PEPCK et de la G6Pase.

FoxO1: Forkhead box protein O1; G6Pase: Glucose-6-Phosphatase; IL-6 : Interleukine-6; PEPCK: PhosphoEnoPyruvate CarboxyKinase; STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3

L'insuline n'est pas la seule hormone produite par le pancréas et capable de contrôler le métabolisme glucidique. Le pancréas sécrète également du glucagon en réponse à la baisse de la glycémie. Le glucagon a globalement des actions opposées à celle de l'insuline sur le métabolisme glucidique du foie. Le glucagon est capable d'induire la production hépatique de glucose en stimulant la glycogénolyse et la néoglucogenèse. Dans ces conditions, la délétion du gène codant pour le glucagon spécifiquement dans les cellules pancréatiques diminue la production hépatique de glucose et la glycémie à jeun chez la souris¹³⁴. La fixation du glucagon sur son récepteur va conduire à l'activation de l'adénylate cyclase et augmenter la production

d'AMPC (Adénosine MonoPhosphate cyclique) dans l'hépatocyte. Cette augmentation d'AMPC va permettre l'activation de la PKA (PhosphoKinase A) qui va phosphoryler plusieurs facteurs de transcription et activer l'expression des enzymes limitantes de la néoglucogenèse¹³⁵. Par exemple, un des substrats de la PKA est la glycogène phosphorylase kinase qui va pouvoir phosphoryler la glycogène phosphorylase et activer cette enzyme limitante dans la voie de la glycogénolyse. Le glucagon peut également permettre la translocation de FoxO1 dans le noyau et l'expression des enzymes de la néoglucogenèse¹³⁶.

A l'instar de l'insuline, le glucagon peut également agir directement sur l'hypothalamus pour moduler la production hépatique de glucose. Des travaux des années 80 avaient déjà montré que le glucagon induisait la dépolarisation des neurones hypothalamiques et pouvait induire l'élévation de la glycémie une fois injecté dans le troisième ventricule au contact de l'hypothalamus^{137,138}. Cependant, 20 ans plus tard l'équipe de T. K. Lam a démontré que le glucagon peut inhiber la production hépatique de glucose en se fixant sur les neurones hypothalamiques¹³⁹. Ces résultats paraissent très surprenants puisque qu'ils contredisent les travaux précédents. De plus, l'action du glucagon sur le foie est opposée et induit la production hépatique de glucose. Dans cette étude, les auteurs proposent que l'action centrale du glucagon s'oppose à son action périphérique pour éviter une élévation trop forte de la glycémie et maintenir l'homéostasie glucidique.

Enfin, il est important de préciser qu'il existe d'autres hormones capables d'induire la production hépatique de glucose. C'est le cas des hormones du stress produites par la glande surrénale : l'adrénaline et les glucocorticoïdes. Le foie exprime le récepteur aux glucocorticoïdes et son activation entraîne l'expression des enzymes néoglucogéniques. A l'inverse, la délétion du récepteur aux glucocorticoïdes induit une hypoglycémie à jeun¹⁴⁰.

iii) Communication inter-organes pour le contrôle de la néoglucogenèse

La régulation de la néoglucogenèse hépatique nécessite une communication fine et permanente entre le foie (lieu de production du glucose) et plusieurs autres organes. Nous avons vu dans la partie précédente qu'une diminution de la lipolyse du tissu adipeux était capable d'inhiber la néoglucogenèse. En outre, cet axe tissu adipeux-foie ne se limite pas au transit des substrats énergétiques. En effet, plusieurs travaux ont mis en évidence que le tissu adipeux pouvait sécréter tout un panel de molécules (appelées adipokines) dont certaines étaient capables de moduler la néoglucogenèse hépatique. C'est par exemple le cas de l'IL-6 qui est capable de stimuler la phosphorylation de STAT-3 dans le foie et d'inhiber l'expression des enzymes impliquées dans la néoglucogenèse hépatique¹⁴¹.

Le tissu adipeux n'est pas le seul organe à pouvoir moduler la production hépatique de glucose. L'intestin est lui aussi fortement impliqué dans son inhibition lors de l'arrivée d'un repas. En effet, nous avons déjà vu par ailleurs que l'arrivée des lipides dans l'intestin induit la diminution de la production hépatique de glucose via un axe intestin-cerveau-foie¹¹⁶. Dans ces études, l'absorption intestinale d'acides gras libres conduit à la libération de la CCK, une hormone capable de stimuler le nerf vague et d'informer le cerveau. Le cerveau inhibe en conséquence la production hépatique de glucose. Dans une autre étude, la stimulation de FXR (Farnesoid X receptor, un récepteur nucléaire aux acides biliaires) spécifiquement au niveau intestinal induit également une diminution de la néoglucogenèse hépatique¹⁴². Cet effet peut être

expliqué par la sécrétion de FGF 15 (Fibroblast Growth Factor 15) par l'intestin en réponse à l'activation de FXR par les acides biliaires¹⁴³. En effet, les taux sanguins de FGF-15 augmentent rapidement au cours d'un repas parallèlement à l'arrivée des acides biliaires dans l'intestin et ce facteur de croissance peut directement induire la baisse de la néoglucogenèse hépatique en inhibant l'expression des enzymes clefs¹⁴⁴.

Ces résultats démontrent que l'arrivée des aliments dans l'intestin va induire la diminution de la néoglucogenèse hépatique par plusieurs mécanismes complémentaires. L'absorption des lipides alimentaires par l'épithélium provoque la sécrétion de CCK. Par ailleurs, la libération des acides biliaires va entraîner la libération de FGF 15. Enfin, comme nous l'avons vu précédemment, les hormones incrétines (GLP-1 et GIP) vont être sécrétées par l'intestin en réponse au glucose, potentialiser la libération d'insuline par le pancréas et inhiber la production de glucose par le foie. De manière générale, plusieurs hormones intestinales libérées lors d'un repas agissent en concert (de manière directe ou indirecte sur le foie) pour permettre la baisse de production hépatique de glucose.

A l'opposé, une étude a mis en évidence que l'intestin était capable de sécréter de la sérotonine au cours du jeûne¹⁴⁵. La sérotonine sécrétée par des cellules entéroendocrines est alors capable de stimuler la production hépatique de glucose par 2 actions synergiques. D'une part, elle va pouvoir stimuler la lipolyse en agissant sur le tissu adipeux et d'autre part elle va induire l'expression de la G6Pase et de la fructose-1-6-biphosphatase deux enzymes clefs de la néoglucogenèse¹⁴⁵.

B. Le diabète

1) Généralités

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) publie des chiffres de plus en plus alarmistes concernant l'augmentation exponentielle de l'incidence de la maladie. En 2014, 422 millions de personnes étaient diagnostiquées diabétiques et l'OMS prévoit qu'en 2030 le diabète sera la septième cause de décès dans le monde. En 2012, on estime que le diabète était à l'origine du décès d'1,5 millions de personnes à travers le monde.

Le diabète est une maladie caractérisée par une hyperglycémie chronique (supérieure à 1,26 g/L de sang à jeun) (**Figure 16**). L'étiologie de la maladie peut avoir 2 origines profondément différentes qui permettent de classer les patients diabétiques en 2 catégories distinctes : les diabétiques de type 1 et les diabétiques de type 2.

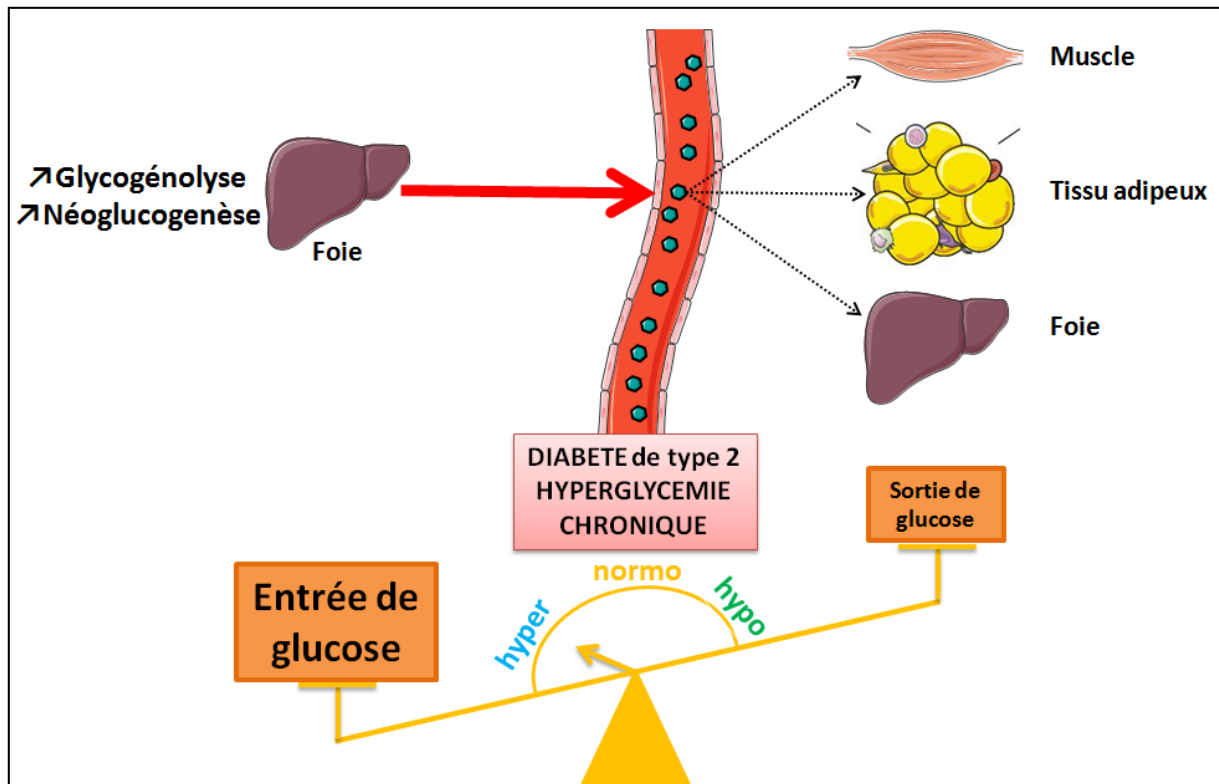


Figure 16 : Représentation schématique de la balance glycémique lors du diabète de type 2.

Le diabète de type 2 est une maladie caractérisée par une hyperglycémie à jeun. Cette hyperglycémie résulte d'une augmentation de la production hépatique de glucose associée à une diminution de son utilisation. Les molécules de glucose sont représentées sous forme d'hexagones vert.

Chez les personnes atteintes du diabète de type 1 l'hyperglycémie est due à un défaut de production d'insuline par le pancréas. On parle dans ce cas de diabète insulino-dépendant. C'est une maladie qui se développe plutôt chez le sujet jeune suite à la destruction des cellules β du pancréas productrices d'insuline. Dans la grande majorité des cas il est observé une destruction de ces cellules par le système immunitaire de la personne malade. L'apparition de l'hyperglycémie est alors rapide et elle se manifeste par une fatigue anormale, l'émission d'urine excessive et une soif intense. Il a aussi pour conséquence un amaigrissement général et cela malgré une prise de nourriture abondante. En effet, l'absence d'insuline ne permet plus l'entrée de glucose dans le muscle et le tissu adipeux ce qui explique l'amaigrissement et la fatigue. Bien que cette maladie soit létale en l'absence de traitement, l'injection d'insuline exogène en réponse à l'hyperglycémie suffit à normaliser la glycémie et à permettre une bonne assimilation du sucre par le patient. Néanmoins, cette procédure nécessite un suivi permanent de la glycémie pour adapter au mieux la dose d'insuline à injecter.

Lors de l'apparition d'un diabète de type 2, l'absence de sécrétion d'insuline par le pancréas n'est pas le facteur déclenchant de la maladie. L'installation du diabète de type 2 se fait de manière beaucoup plus insidieuse sans que les symptômes ne soient alarmants.

Classiquement, l'évolution de la maladie peut se découper en 3 stades¹⁴⁶. Premièrement, une diminution de la sensibilité à l'insuline est observée chez les malades. Autrement dit,

l'insuline n'est plus capable d'induire efficacement la baisse de la glycémie. Dans le premier stade de la maladie, cette résistance à l'insuline est compensée par une augmentation de sa sécrétion. Les sujets sont donc normoglycémiques mais hyperinsulinémiques et cette phase est asymptomatique (**Figure 17 ; Stade 1**). Par la suite, la sensibilité à l'insuline va encore se dégrader et l'hypersecretion d'insuline ne va plus pouvoir compenser cette insulino-résistance. L'insulino-résistance va avoir 2 conséquences majeures : un défaut de captation de glucose par le muscle et le tissu adipeux et une augmentation de la production hépatique de glucose. Ces 2 facteurs vont conduire à l'établissement d'une hyperglycémie chronique chez le patient qui sera donc à ce stade hyperinsulinémique et hyperglycémique (**Figure 17 ; Stade 2**). Enfin, le stade terminal de la maladie se caractérise par un épuisement du pancréas et à une chute de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. L'insulino-résistance est donc couplée à un défaut de sécrétion d'insuline (insulinopénie) et le patient est donc hypoinsulinémique et hyperglycémique (**Figure 17 ; Stade 3**). Sur le papier, il est facile de scinder l'évolution de la maladie en 3 phases mais la succession chronologique de ces événements n'est pas retrouvée chez tous les patients. Bien souvent, l'insulinopénie et l'insulino-résistance participent simultanément et à des degrés variables à l'établissement de l'hyperglycémie chronique.

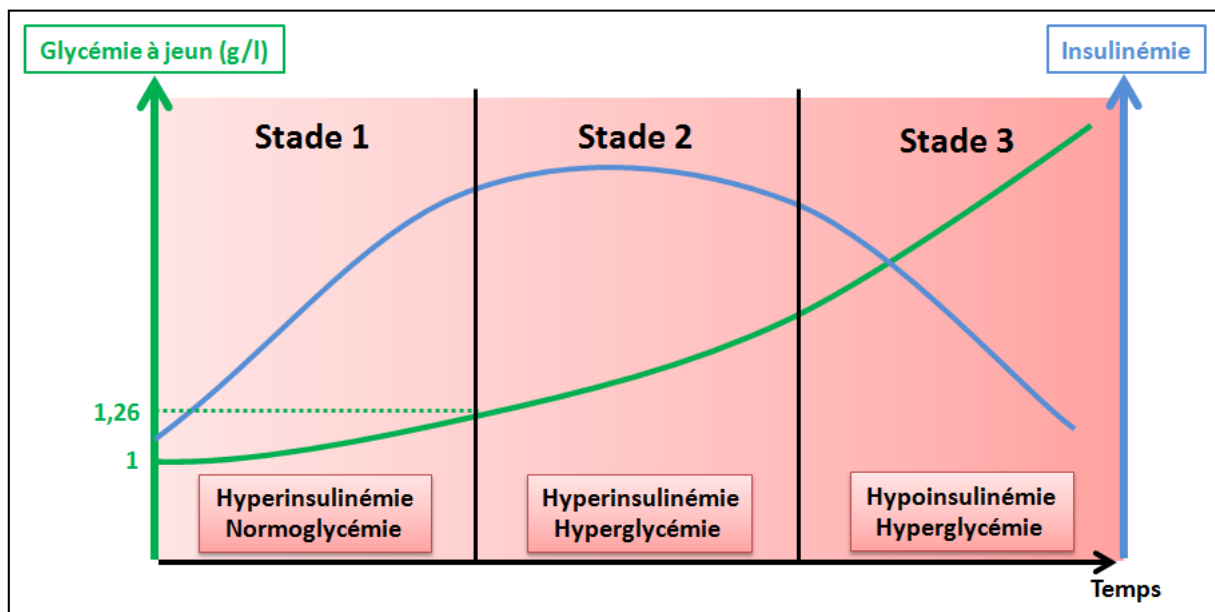


Figure 17: Représentation simplifiée de la progression de l'insulino-résistance lors du développement du diabète de type 2.

La progression de diabète de type 2 peut se décomposer en 3 phases. Dans le premier stade de la maladie (Stade 1) le patient est hyperinsulinémique et normoglycémique. Par la suite, l'augmentation de la production d'insuline par le pancréas ne suffit plus à maintenir la glycémie, le patient est alors hyperinsulinémique et hyperglycémique (Stade 2). Enfin, le dernier stade (Stade 3) se caractérise par un effondrement de la production d'insuline par le pancréas, le patient est alors hypoinsulinémique et hyperglycémique.

Comme la plupart des maladies, des prédispositions génétiques et des facteurs environnementaux peuvent conduire au développement du diabète de type 2. Néanmoins, l'augmentation exponentielle du nombre de personnes malades laisse penser que ce sont les changements environnementaux qui jouent un rôle majeur dans l'incidence de la maladie. En effet, le manque d'exercice physique ainsi qu'une nourriture riche en graisses et en sucres sont 2

déterminants majeurs conduisant au diabète¹⁴⁷. Par ailleurs, le diabète est très souvent associé à l'obésité et il est constaté que la grande majorité des diabétiques de type 2 déclarés sont obèses¹⁴⁶.

De manière générale, l'hyperglycémie à jeun provoquée par la résistance à l'insuline est rarement seule sur le tableau clinique du patient. Celle-ci est souvent associée à d'autres troubles métaboliques comme l'obésité, l'hypertension ou encore la stéatose hépatique. Tous ces troubles, retrouvés en combinaisons variables chez les patients diabétiques, sont regroupés sous le terme général de syndrome métabolique.

2) Le diabète est une maladie inflammatoire chronique

Comme nous l'avons dit précédemment la mise en place du diabète de type 2 commence par l'établissement insidieux de la résistance à l'insuline. Le défaut d'action de l'insuline implique plusieurs mécanismes moléculaires, mais il est maintenant établi que **l'apparition d'un état inflammatoire chronique et de bas grade chez le patient joue un rôle majeur dans le développement de l'insulinorésistance**. Cet état inflammatoire n'est pas comparable à celui retrouvé lors d'une infection ou lors d'une blessure où le recrutement du système immunitaire est majeur, rapide et transitoire. Chez les personnes diabétiques, il est plutôt constaté une augmentation chronique des concentrations sanguines de plusieurs médiateurs pro inflammatoires comme le TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), IL-1, la protéine C réactive ou encore PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor 1). Le TNF- α est la première cytokine clairement impliquée dans l'insulinorésistance. Il y a environ 25 ans, Hotamisligil G.S. *et al.* ont découvert que les taux sanguins de TNF- α étaient augmentés chez les rats obèses diabétiques et que la neutralisation de cette molécule améliorait la sensibilité à l'insuline¹⁴⁸. Dès lors, plusieurs études ont cherché à découvrir l'origine cellulaire de cette inflammation et les macrophages ont été identifiés comme des cellules clefs. En effet, la déplétion en macrophages améliore la sensibilité à l'insuline des souris¹⁴⁹. Au cours des maladies métaboliques, les macrophages ne sont pas les seules cellules capables de sécréter des cytokines inflammatoires et d'autres cellules immunitaires comme les lymphocytes, les mastocytes ou les polynucléaires éosinophiles sont également impliquées. Dans ces conditions, les organes cibles de l'insuline comme le tissu adipeux, le muscle et le foie vont baigner dans un environnement riche en cytokines pro-inflammatoires qui vont pouvoir interférer avec la voie de signalisation en aval du récepteur à l'insuline. L'insuline agira alors de manière moins efficace et l'insulinorésistance va progressivement s'installer. Par ailleurs, nous détaillerons dans la 3^{ème} partie de l'introduction le rôle prépondérant du microbiote dans l'activation du système immunitaire au cours du diabète.

3) Le foie: un organe clef dans l'installation de l'hyperglycémie

Le foie est une des cibles majeures pour le traitement du diabète de type 2. En effet, la diminution de la production hépatique de glucose, anormalement élevée chez le diabétique, est cruciale pour s'opposer à l'hyperglycémie chronique. L'augmentation de la production hépatique de glucose au cours du diabète est essentiellement due à une augmentation de la

néoglucogenèse hépatique¹⁵⁰. Cette augmentation est due à la combinaison de plusieurs facteurs comme l'augmentation des substrats néoglucogéniques, la résistance hépatique à l'insuline, qui entraîne un défaut d'inhibition de la néoglucogenèse, ou l'augmentation de la concentration du glucagon circulant stimulant alors la synthèse de glucose.

A ce jour, le traitement antidiabétique le plus utilisé agissant sur la production hépatique de glucose est la metformine. Au vu de la complexité et de la redondance des mécanismes mis en place pour réguler la production hépatique de glucose (**cf Introduction II-A-3**) il est intéressant de se demander comment la metformine agit pour la diminuer. La réponse à cette question est encore controversée, d'autant plus que ce médicament induit une baisse de la production hépatique de glucose sans stimuler la sécrétion d'insuline¹⁵¹. Plusieurs études ont montré que la metformine avait des effets directs sur le foie. Au départ, la metformine a été décrite comme étant capable d'activer l'AMPK (AMP-Activated Protein Kinase), une protéine kinase fortement impliquée dans le métabolisme cellulaire^{152,153}. Cette protéine est un véritable senseur énergétique cellulaire. Lorsque la concentration en ATP diminue dans la cellule (le ratio AMP/ATP est alors élevé) l'AMPK s'active pour rééquilibrer ce rapport. Elle va alors stimuler des voies cataboliques impliquées dans la synthèse d'ATP (oxydation des acides gras, glycolyse) et inhiber des voies anaboliques ou consommatrices d'ATP (synthèse des protéines, d'acides gras ou de glucose). Dans ces conditions, l'activation de l'AMPK hépatique par la metformine va aboutir à une diminution de la néoglucogenèse hépatique. De plus, une autre étude est venue confirmer cette action puisque la délétion hépatique de la protéine LKB1 (Liver Kinase B1, une kinase activatrice de l'AMPK) chez la souris bloque les effets antidiabétiques de la metformine¹⁵³. Cependant, ces résultats ont été remis en question puisque qu'une étude française a démontré que la délétion hépatique de l'AMPK n'affecte absolument pas l'efficacité de la metformine¹⁵⁴. Ces résultats suggèrent que l'AMPK n'est pas la seule protéine ciblée par la metformine. D'autres hypothèses ont donc vu le jour et une étude a montré que la metformine interagissait avec la voie de signalisation du glucagon en inhibant son effet sur le foie¹⁵⁵. Encore plus récemment, les travaux de Madiraju A.K. *et al.* ont démontré que la metformine pouvait baisser le ratio intracellulaire de NADH/NAD⁺ et induire une baisse de néoglucogenèse¹⁵⁶. Tous ces travaux ont mis en évidence que la metformine agit directement sur le foie et bloque la néoglucogenèse grâce à plusieurs actions complémentaires. De plus, d'autres études ont pu montrer que la metformine pouvait diminuer la néoglucogenèse hépatique en agissant sur d'autres organes. En effet, le laboratoire de T. K. Lam a démontré, chez le rongeur, que la metformine pouvait activer l'AMPK au niveau du duodénum et induire la baisse de néoglucogenèse *via* un axe de communication entre l'intestin, le cerveau et le foie¹⁵⁷. Certaines études effectuées chez l'Homme et chez la souris suggèrent même que les effets de la metformine pourraient impliquer le microbiote intestinal¹⁵⁸⁻¹⁶⁰.

La description des différents modes d'actions de la metformine pour inhiber la néoglucogenèse met en lumière **l'importance de combiner plusieurs cibles moléculaires pour baisser efficacement la glycémie**. L'effet pléiotrope de la metformine place ce médicament parmi les plus efficaces et les plus utilisés à travers le monde pour traiter le diabète de type 2.

III- Implication du microbiote intestinal dans le développement des maladies métaboliques

A. Le microbiote intestinal est modifié au cours des maladies métaboliques

L'implication du microbiote intestinal dans le développement des maladies métaboliques est issue d'un constat simple : **les patients obèses et diabétiques ont un microbiote différent de celui des sujets sains**. Cette découverte est finalement assez récente puisque que les premiers travaux mettant en évidence ces différences datent de 2005-2006¹⁶¹⁻¹⁶³. A cette époque, l'équipe de J.I. Gordon a publié, dans le même numéro de la revue *Nature*, 2 articles scientifiques qui ont posé les bases du concept de dysbiose intestinale chez l'Homme et la souris lors des maladies métaboliques^{162,163}. Dans la première étude, les auteurs ont utilisé le modèle de souris ob/ob génétiquement modifiées¹⁶². Les souris ob/ob sont invalidées pour le gène codant pour une hormone satiétogène : la leptine. Cette invalidation entraîne une hyperphagie, les souris absorbent alors beaucoup plus de calories qu'elles n'en consomment et développent rapidement une obésité sévère. Les auteurs ont mis en évidence que le microbiote de ces souris obèses était plus riche en *Firmicutes* et plus pauvre en *Bacteroidetes* que celui des souris minces¹⁶². Ces différences taxonomiques semblent avoir des conséquences fonctionnelles puisque le microbiote des souris obèses produit plus d'acides gras à chaîne courte. De plus, les fèces des souris ob/ob sont plus pauvres en calories suggérant que le microbiote intestinal a pu extraire, par fermentation, plus de calories du régime alimentaire. Ces calories absorbées par la souris sont donc absentes des fèces. Ces résultats mettent en évidence des différences de microbiote mais ne permettent pas de savoir si ces différences jouent un rôle dans le développement de la maladie. Pour répondre à cette question, les bactéries intestinales contenues dans les fèces des souris minces et de souris obèses ont été isolées et transférées dans 2 groupes de souris axéniques (on parle ici de colonisation). Les souris axéniques colonisées avec le microbiote de souris obèses ont grossi plus vite et sont devenues plus grasses que les souris colonisées avec le microbiote de souris minces. Ces résultats suggèrent que les bactéries intestinales présentes chez les souris obèses participent à la prise de masse grasse (**Figure 18**).

Dans l'autre étude parue simultanément, les auteurs ont confirmé chez l'Homme l'augmentation des *Firmicutes* et la baisse des *Bacteroidetes* trouvées chez les souris¹⁶³. De plus, lorsque les patients obèses ont été soumis à un régime amaigrissant, la proportion relative des *Firmicutes* a diminuée et celle des *Bacteroidetes* a augmentée pour ressembler au microbiote observé chez les sujets minces. Ces 2 articles ont posé les bases du concept de dysbiose intestinale chez les patients et les souris.

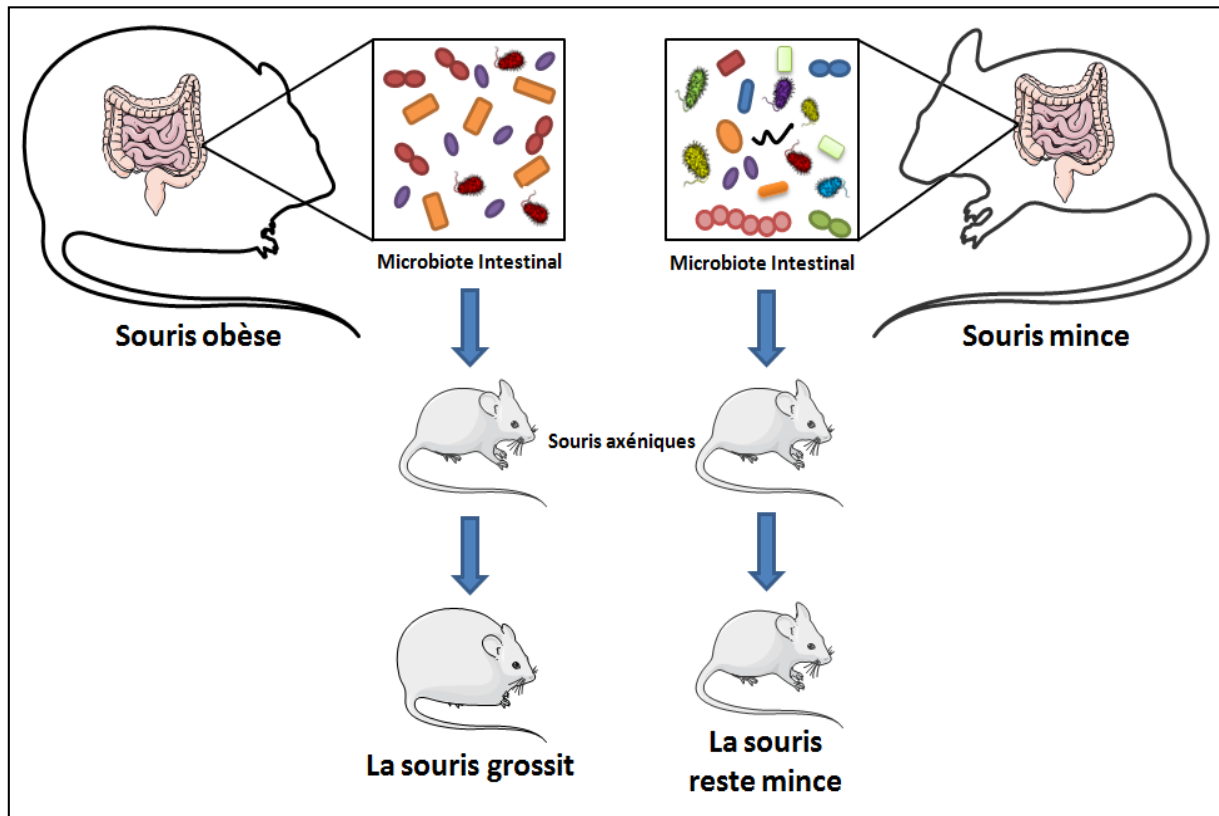


Figure 18: Colonisation des souris axéniques avec le microbiote de souris minces ou obèses.

Les souris obèses ont un microbiote moins diversifié que les souris minces. Une fois transféré dans des souris axéniques, le microbiote d'une souris obèse induit une prise de masse grasse supérieure à celui d'une souris mince.

Un an et demi plus tard, le même laboratoire a publié un nouvel article dans lequel la dysbiose du microbiote intestinal est observée dans un autre modèle de souris obèse¹⁶⁴. Dans cette étude, les auteurs ont confirmé les résultats obtenus en 2006 chez la souris ob/ob dans un modèle de souris non transgénique dont l'obésité est induite par un facteur environnemental : le régime hyperlipidique. Afin que les souris aient un microbiote similaire dès le départ du régime, les auteurs ont choisi de coloniser un grand groupe de souris axéniques avec la flore d'un seul et même donneur. Ces souris ainsi colonisées ont ensuite été séparées en 2 groupes : un groupe nourri avec un régime normal et un groupe nourri avec un régime hyperlipidique. Ces travaux ont mis en avant de manière indiscutable le rôle majeur du régime alimentaire sur le microbiote intestinal (*cf Introduction I-C-2*). Les auteurs ont pu montrer que le régime alimentaire hyperlipidique conduisait à l'apparition d'un microbiote moins diversifié, plus riche en *Firmicutes* et pauvre en *Bacteroidetes*¹⁶⁴. Ces modifications ont été retrouvées chez des souris conventionnelles (nées et colonisées naturellement avec un microbiote) et chez des souris invalidées pour certains gènes de l'immunité (*MyD88*^{-/-} ou *Rag1*^{-/-}) nourries avec un régime hyperlipidique. L'ensemble de ces données suggère que le régime alimentaire conduisant à l'obésité induit de profondes modifications du microbiote reproductibles dans plusieurs modèles de souris. Par ailleurs, le transfert de ce microbiote modifié est capable d'augmenter significativement la masse grasse chez les souris axéniques colonisées.

Ces travaux ont ouvert la voie à de nombreuses études et des dizaines d'articles scientifiques décrivent de manière plus ou moins fine les modifications du microbiote retrouvées lors des maladies métaboliques. De manière générale, plusieurs études chez l'Homme et chez la souris montrent que l'obésité est associée à une baisse de la diversité du microbiote^{23,58,164,165}. Chez l'Homme, le nombre de gènes microbiens différents est plus élevé dans le microbiote des personnes minces que dans celui des personnes obèses¹⁶⁵. En ce qui concerne la taxonomie, les premiers travaux du laboratoire de J.I. Gordon ont montré que le microbiote des Hommes et des souris obèses était caractérisé par une augmentation des *Firmicutes* et diminution des *Bacteroidetes* (**cf paragraphe précédent**). Ces résultats ne sont pas confirmés dans toutes les études¹⁶⁶ et une étude reporte même l'inverse¹⁶⁷. Les modifications du microbiote dans des modèles de rongeurs ob/ob décrites par J.I. Gordon sont aussi sujettes à controverses. En effet, une étude Irlandaise a montré que le microbiote des souris ob/ob n'était pas plus efficace pour extraire les kilocalories du régime¹⁶⁸. Par ailleurs, dans cette étude, l'augmentation des *Firmicutes* et la baisse des *Bacteroidetes* n'est pas clairement mise en évidence chez les souris ob/ob¹⁶⁸. Chez les souris db/db (souris invalidées pour le récepteur à la leptine et également hyperphagiques) l'augmentation des *Firmicutes* et des *Bacteroidetes* est retrouvée dans plusieurs études^{169,170}. A l'inverse, le microbiote des rats Zucker (modèle de rats équivalent aux souris db/db) n'est pas différent de celui d'un rat sauvage maigre¹⁷¹. **De manière générale, l'obésité est associée à une diminution de la diversité microbienne mais les variations précises des différentes espèces bactériennes ne sont pas clairement identifiées.**

Chez les patients diabétiques le constat est le même. La communauté scientifique s'accorde à dire que le microbiote de patients diabétiques est différent de celui de sujets sains sans pour autant qu'il y ait un consensus sur les différences retrouvées. Par exemple, Qin J. *et al.* ont montré dans une population chinoise de 345 individus que l'augmentation de plusieurs espèces de *Clostridium* dans l'intestin des patients diabétiques serait un marqueur potentiel de la maladie¹⁷². A l'inverse, Karlsson F.H. *et al.*, qui ont analysé une cohorte de 145 femmes européennes, ont montré une diminution significative des *Clostridium* et une augmentation des *Lactobacilles* dans le microbiote des femmes diabétiques de type 2¹⁷³. Ces deux études, parues à moins d'un an d'intervalle, retrouvent des différences de microbiote intestinal chez les patients diabétiques sans pour autant identifier la même signature bactérienne. De nombreuses hypothèses peuvent expliquer ces différences, parmi elles, la différence de régime alimentaire ou d'environnement entre un groupe d'hommes chinois et une cohorte de femmes européennes. Par ailleurs, le traitement médicamenteux donné à ces patients diabétiques pourrait aussi expliquer en partie ces résultats¹⁶⁰. En effet, au sein d'une même population de patients diabétiques, ceux traités à la metformine ont un microbiote différent de celui des patients non traités. Cette hétérogénéité peut alors compromettre fortement l'identification d'une signature bactérienne du diabète commune à toutes les personnes diabétiques.

B. Comment le microbiote intestinal participe-t-il au développement des maladies métaboliques ?

1) Le modèle de souris axéniques

Pour évaluer la fonction d'un gène, la technique la plus communément utilisée en biologie est de regarder l'impact de sa délétion sur le modèle étudié. Les premiers travaux s'intéressant au microbiote ont suivi la même logique. Pour comprendre le rôle du microbiote sur la physiologie, l'étude d'animaux sans microbiote (axéniques) est apparue très tôt comme un modèle de choix. Les premières colonies de rats axéniques ont vu le jour en 1946 aux Etats-Unis dans l'université de Notre Dame dans l'Indiana grâce aux travaux de Reyniers J.A.¹⁷⁴. Deux ans plus tard, la même équipe annonçait dans le journal *Nature* avoir réussi à élever une autre espèce vertébrée en condition stérile : les poulets axéniques étaient nés¹⁷⁵. Dès la mise en place des premières colonies de souris axéniques, les auteurs ont constaté que ces souris étaient plus petites et plus maigres que les souris naturellement colonisées par un microbiote¹⁷⁶. Dans les années 1970-1980, Wostmann B.S. (un autre chercheur de l'université de Notre Dame, Indiana) a consacré une bonne partie de sa carrière scientifique à étudier les rats axéniques. Il a d'ailleurs décrit toutes ces observations dans une revue¹⁷⁷. A travers ces travaux, il a pu montrer que les rats adultes axéniques excrétaient 87% de calories en plus dans leurs fèces¹⁷⁸. Cette malabsorption calorique était compensée chez ces animaux par une augmentation de la prise alimentaire de 20%. Par ailleurs, la dépense calorique mesurée chez des souris axéniques et conventionnelles était identique¹⁷⁸.

Vingt ans plus tard, Bäckhed F. *et al.*, ont retrouvé ces phénotypes en constatant que les souris conventionnelles avaient 40% de masse grasse en plus que les souris axéniques¹⁷⁹. De manière surprenante les souris axéniques mangent plus que les souris conventionnelles. D'autre part, la conventionnalisation des souris axéniques avec un microbiote intestinal induit une augmentation de 60% de la masse grasse en 2 semaines malgré une réduction de la prise alimentaire de 30%¹⁷⁹. De plus, les souris axéniques sont plus tolérantes au glucose et plus sensibles à l'insuline comparativement aux souris conventionnelles. Dans cet article les auteurs proposent que le microbiote agisse par 2 phénomènes complémentaires. D'une part, il augmente la dégradation des fibres alimentaires du régime et permet une meilleure assimilation du repas. D'autre part, il stimule le stockage des acides gras libres circulants dans les adipocytes en réprimant la sécrétion intestinale d'un inhibiteur de la LPL (LipoProtéine Lipase) appelé ANGPTL4 (ANGioPoiTein-Like protein 4, anciennement nommé FIAF Fasting-Induced Adipocyte Factor).

Quelques années plus tard Bäckhed F. *et al.* ont également démontré que les souris axéniques prenaient significativement moins de poids lorsqu'elles étaient nourries avec un régime hyperlipidique comparativement à des souris axéniques colonisées avec un microbiote¹⁸⁰. Dans cette étude, après 2 mois de régime hyperlipidique, les souris conventionnelles ont grossi de 6 g en moyenne contre seulement 1 g pour les souris axéniques. Ces résultats ont été reproduits par une équipe française qui a démontré qu'en plus d'être

résistantes à l'obésité induite par le régime hyperlipidique, les souris axéniques étaient également résistantes au développement du diabète de type 2181. Ces résultats suggèrent que la présence de bactéries dans l'intestin est nécessaire au développement des maladies métaboliques.

2) Le microbiote transforme le contenu luminal intestinal

Le microbiote intestinal est capable de transformer le contenu intestinal. Il est capable de métaboliser certains constituants du régime, les acides biliaires, le mucus et plus généralement quasiment toutes les molécules qui se trouvent à sa portée. La transformation de tous ces composés n'est pas sans conséquences et elle peut aboutir à la formation de substances absorbables et utilisables par l'hôte. Nous verrons dans cette partie que certaines molécules produites peuvent servir de substrats énergétiques mais aussi de molécules signalisantes aux effets pléiotropes.

a. La fermentation des polysaccharides par le microbiote

Les fibres alimentaires non digestibles par les enzymes eucaryotes arrivent intactes dans le côlon et constituent une importante source énergétique pour les bactéries intestinales. Pour métaboliser ces fibres, certaines bactéries possèdent un arsenal important de glycosidases et lyases aux activités catalytiques complémentaires. Par exemple, une souche bactérienne comme *Bacteroides thetaiotaomicron* exprime deux fois plus d'hydrolases que l'Homme et peut donc cliver presque tous les polysaccharides complexes¹⁸². La fermentation bactérienne aboutie à la production d'Acides Gras à Chaîne Courte (AGCC) directement assimilables par l'hôte. Ces AGCC (acétate, propionate et butyrate) peuvent être utilisés comme source énergétique une fois absorbés par l'intestin¹⁸³. Le butyrate est d'ailleurs le principal substrat énergétique des entérocytes de la paroi du côlon (**cf Introduction I-D-1)-b.**). Par ailleurs, nous avons vu précédemment que le propionate était un substrat non négligeable lors de la néoglucogenèse (**cf Introduction II-A-3)-b.**). L'importance relative de cette source énergétique est variable entre les espèces animales et l'on estime que 5-8% des calories sont apportées par le métabolisme des AGCC chez l'Homme¹⁸⁴. En revanche chez la vache 70% de ces besoins énergétiques sont couverts par la production d'AGCC par son microbiote¹⁸⁴ (**Figure 19**).

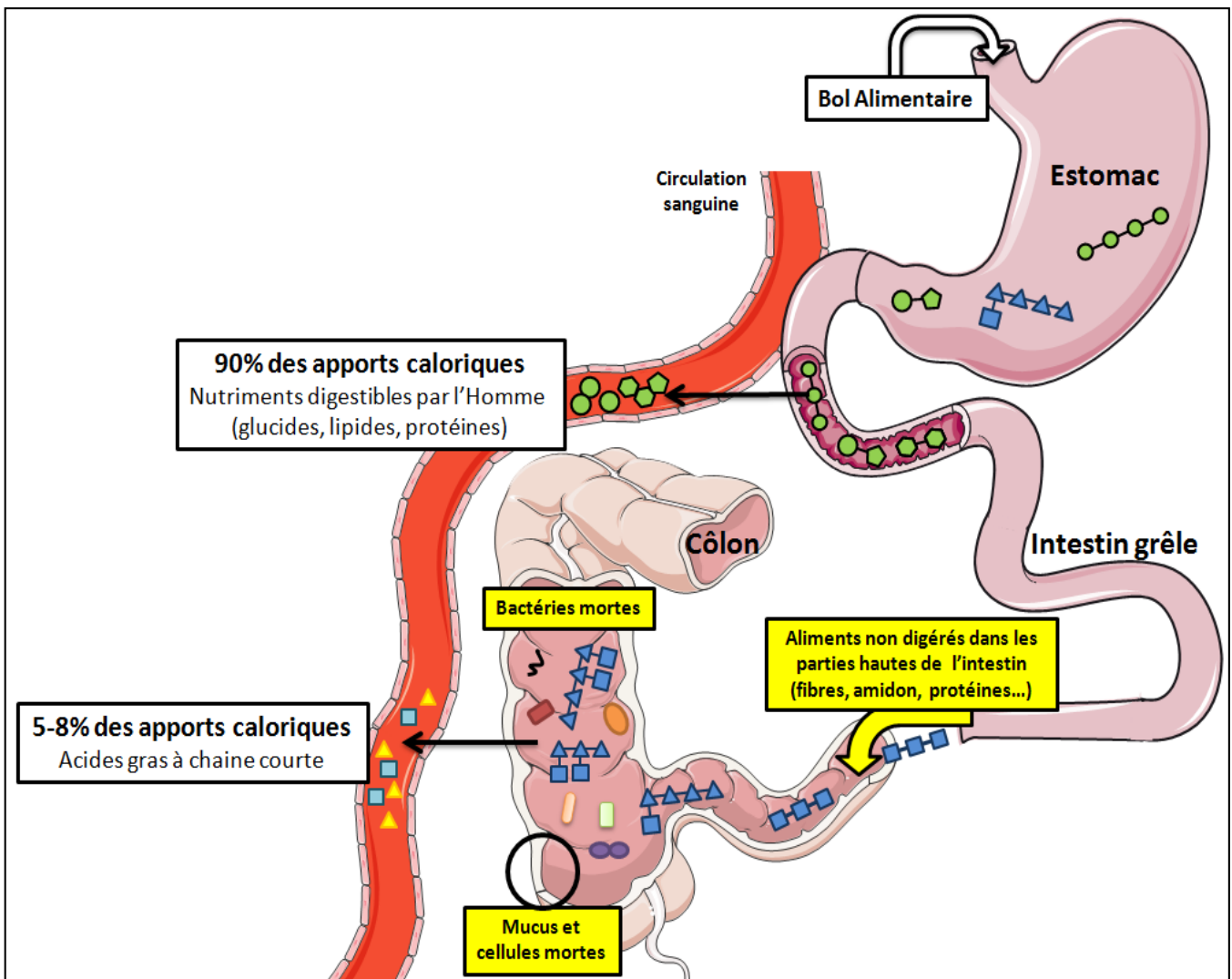


Figure 19: Les principales sources énergétiques de l'hôte et de ses bactéries intestinales.

Lors de l'arrivée d'un bol alimentaire dans l'intestin la grande majorité des glucides, des lipides et des protéines est absorbée dès la sortie de l'estomac. Ces sources énergétiques représentent 90% de nos apports caloriques quotidiens. Certains composés comme les fibres, les résidus d'amidon ou certaines protéines ne sont pas absorbés dans les parties hautes de l'intestin et sont utilisés comme sources énergétiques par les bactéries intestinales. Les bactéries peuvent également se nourrir de mucus, de cellules intestinales desquamées ou de bactéries mortes. La fermentation des fibres aboutit à la production d'acides gras à chaîne courte absorbables par l'hôte et qui constituent une source énergétique supplémentaire estimée à 5-8% des apports caloriques chez l'Homme.

Les substrats énergétiques digestibles dans les parties hautes de l'intestin (glucides, lipides, protéines) sont représentés en vert et les substrats non digestibles en bleu. Les acides gras à chaîne courte sont représentés par des triangles jaunes et des carrés bleus.

Les AGCC sont également des molécules signalisantes pouvant agir *via* l'intermédiaire de deux récepteurs FFAR2 (Free Fatty Acid Receptor 2 ou GPR43 G-Protein-coupled Receptor 43) et FFAR3 (Free Fatty Acid Receptor 3 ou GPR41 G-Protein-coupled Receptor 41). Ces récepteurs se trouvent sur plusieurs types cellulaires et en particulier sur les cellules intestinales et immunitaires. Il a d'ailleurs été démontré que les AGCC étaient capables d'induire la prolifération des lymphocytes anti-inflammatoires T régulateurs en agissant par l'intermédiaire du récepteur FFAR2^{59,97,98}. Cette activation est capable de protéger du développement de la colite chez la souris. Ces effets anti-inflammatoires ont également été observés à distance de

l'intestin puisque des souris dont le microbiote intestinal produisait beaucoup de propionate étaient moins sensibles aux allergies pulmonaires causées par les acariens. A l'inverse, des souris nourries avec un régime pauvre en fibres, et par conséquent présentant des taux sanguins de propionate plus faibles étaient, quant à elles, très sensibles aux allergies pulmonaires⁵⁹.

Par ailleurs, les AGCC ont aussi un rôle majeur dans la régulation du métabolisme glucidique. En effet, plusieurs études ont montré que les AGCC pouvaient agir localement sur l'intestin et induire la production de GLP-1^{185,186}. Le GLP-1 ainsi produit va pouvoir potentialiser la sécrétion d'insuline et participer à la baisse de la glycémie. Ces résultats ont récemment été retrouvés par l'équipe de T. K. Lam¹⁸⁷. Les auteurs ont montré que le propionate était capable d'induire la sécrétion de GLP-1 en se fixant sur son récepteur FFAR2 au niveau des cellules entéro-endocrines. La sécrétion de GLP-1 est alors capable de diminuer la production hépatique de glucose en agissant *via* le cerveau. En effet, le blocage des afférences vagales par un composé chimique empêche le GLP-1 d'induire une baisse de production hépatique de glucose¹⁸⁷ (**Figure 20**). Dans une autre étude, De Vadder F. *et al.*, ont également mesuré un effet inhibiteur des AGCC sur la production hépatique de glucose¹⁸⁸. Les auteurs ont d'abord constaté qu'un régime enrichi en fibres ou en butyrate provoquait une diminution de l'activité de la G6Pase hépatique chez les rongeurs, une enzyme clef dans la production hépatique de glucose. Là encore cet effet nécessite la communication entre l'intestin, le cerveau et le foie. Les auteurs ont démontré que les AGCC pouvaient inhiber la production hépatique de glucose en induisant la néoglucogenèse intestinale. En effet, le glucose produit lors de l'activation de la néoglucogenèse intestinale est libéré localement, drainé par la veine porte et détecté par les terminaisons nerveuses du nerf vague situées dans la paroi du vaisseau sanguin. Un message nerveux afférent est alors émis et le cerveau est informé de l'augmentation du glucose dans la veine porte. Le cerveau va ensuite envoyer un message nerveux efférent vers le foie qui inhibe de la production hépatique de glucose. Dans cet article, la production intestinale de glucose n'a pas pour objectif de s'opposer à la baisse de la glycémie mais elle permet d'informer le cerveau de l'arrivée du bol alimentaire (**Figure 20**).

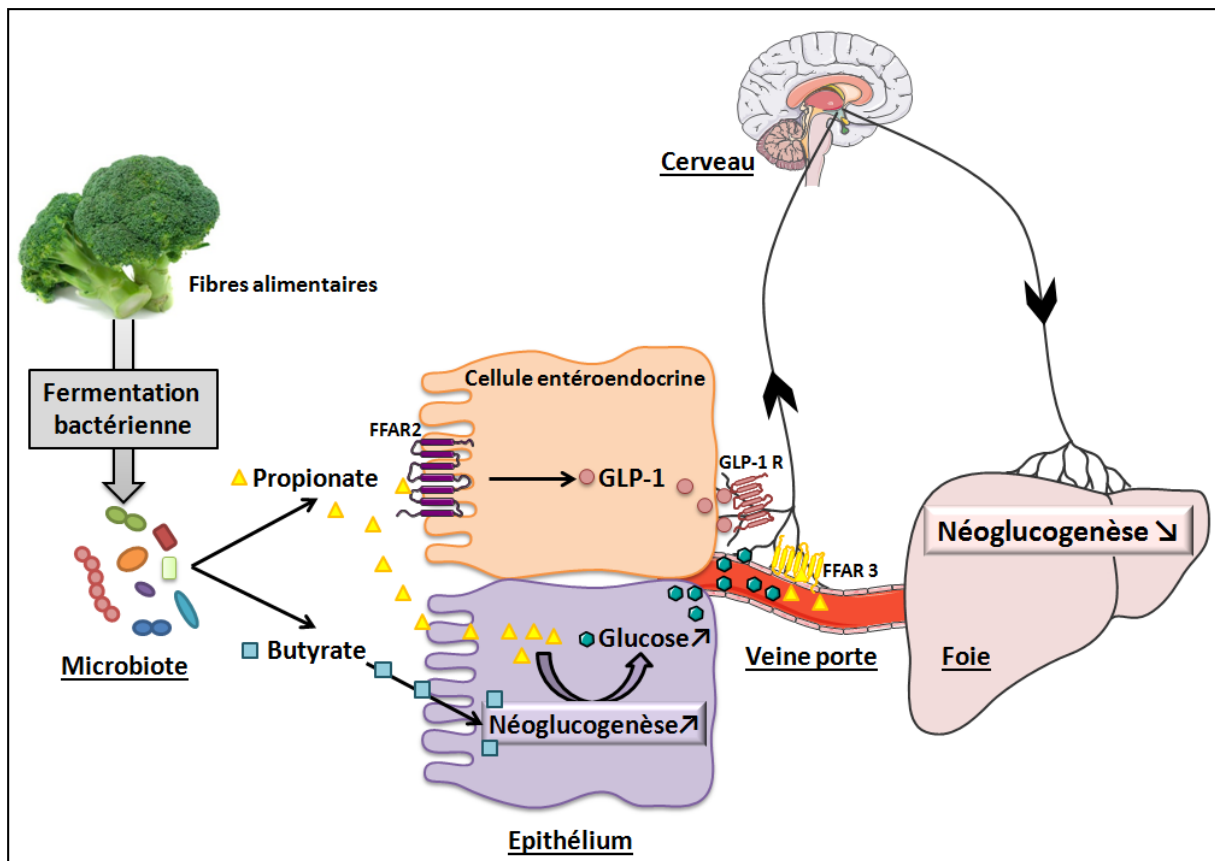


Figure 20: Régulation de la production hépatique de glucose par les acides gras à chaîne courte.

Les fibres contenues dans le bol alimentaire parviennent au contact des bactéries intestinales et sont fermentées. Cette fermentation conduit à la production d'acides gras à chaîne courte comme le propionate (triangles jaunes) ou le butyrate (carrés bleus) par le microbiote. Ces acides gras vont pouvoir agir sur l'épithélium intestinal et inhiber la production hépatique de glucose par au moins 2 phénomènes. Le propionate va se fixer sur son récepteur FFAR2 (Free Fatty Acid Receptor 2) au niveau des cellules entéroendocrines et promouvoir la sécrétion de GLP-1¹⁸⁷. Le GLP-1 va alors se fixer sur son récepteur situé sur les terminaisons afférentes du nerf vague et induire une diminution de la production hépatique de glucose par l'activation de l'axe intestin-cerveau-foie¹⁸⁹. Le propionate peut également induire la néoglucogenèse intestinale en stimulant le nerf vague *via* son récepteur FFAR3 (Free Fatty Acid Receptor 3)¹⁸⁸. La stimulation du nerf vague va induire la production intestinale de glucose grâce à un relais central¹⁸⁸. Le propionate est également lui-même un substrat néoglucogénique pouvant être converti en glucose par l'entérocyte. Par ailleurs, le butyrate va, quant à lui, activer la néoglucogenèse intestinale en agissant directement sur l'entérocyte. L'activation par les acides gras à chaîne courte de la néoglucogenèse intestinale va provoquer une augmentation du glucose dans la veine porte. Le glucose va alors stimuler les afférences vagales innervant les parois de la veine porte et induire une baisse de la production hépatique de glucose *via* un relais central¹⁸⁸.

b. Le microbiote ne métabolise pas uniquement les fibres alimentaires

Le microbiote intestinal est capable de métaboliser une variété importante de composés présents dans le régime alimentaire. Par exemple, le métabolisme de la choline par le microbiote intestinal a été impliqué de manière causale dans le développement des maladies cardiovasculaires^{190,191}. Cette découverte est basée sur l'étude des métabolites présents dans le sang des patients ayant développé des plaques d'athéromes. Une plaque d'athérome est un dépôt ectopique de cholestérol dans les vaisseaux pouvant conduire à des maladies cardiovasculaires. Chez ces patients, les auteurs ont constaté un taux élevé de TMAO (TriMéthylAmine-N-Oxyde). La synthèse du TMAO commence dans l'intestin et a pour

précurseur la choline. En effet, la choline, un composant du régime alimentaire, est métabolisé par les bactéries intestinales qui produisent un composé intermédiaire : la triméthylamine. La triméthylamine est alors absorbée et rapidement oxydée par le foie en TMAO. La TMAO ainsi produite peut réduire l'élimination du cholestérol par l'organisme et favoriser son accumulation dans les plaques d'athéromes. Cet exemple met en lumière le rôle du microbiote dans la production de métabolites actifs sur l'hôte. Un autre article a également démontré que le métabolisme de la L-carnitine par le microbiote pouvait également aboutir à la formation de TMAO et participer au développement des plaques d'athéromes¹⁹². De plus, l'inhibition de l'enzyme microbienne responsable de la synthèse de triméthylamine par un composé pharmacologique (le 3,3-diméthyl-1-butanol, naturellement présent dans l'huile d'olive ou le vin) prévient le développement de l'athérosclérose chez la souris¹⁹³. Ces résultats illustrent concrètement que cibler le microbiote intestinal pour traiter certaines maladies n'est pas utopique.

Par ailleurs, une étude publiée par le groupe d'E. Elinav, a révélé que certains édulcorants alimentaires présents dans la nourriture industrielle (comme la saccharine, le sucralose ou l'aspartame) pouvaient impacter le microbiote et altérer la gestion de la glycémie¹⁹⁴. En effet, ces composés sont capables de modifier certaines voies métaboliques microbiennes et ainsi de favoriser l'apparition de l'intolérance au glucose chez la souris mais également chez l'Homme¹⁹⁴.

Le métabolisme du régime par le microbiote peut également contrôler la prise alimentaire. En effet, une équipe française a mis en évidence que certaines bactéries intestinales comme *Escherichia coli* produisaient des protéines différentes en fonction de leurs états prolifératifs¹⁹⁵. Lors de l'arrivée des nutriments dans l'intestin les bactéries prolifèrent et les protéines qu'elles sécrètent sont capables d'induire la sécrétion de GLP-1. A l'opposée, l'arrêt de la prolifération bactérienne s'accompagne de la sécrétion d'autres protéines capables de stimuler la production d'une hormone satiétogène le PYY (Peptide tYrosine tYrosine) par l'intestin¹⁹⁵. Cette étude démontre que le protéome bactérien (*i.e.* l'ensemble des protéines exprimées par les bactéries) participe de manière coordonnée à la régulation de l'homéostasie énergétique de son hôte.

c. Métabolisme des acides biliaires par le microbiote

L'implication des acides biliaires dans le développement des maladies métaboliques ne fait aucun doute. Les acides biliaires permettent la formation des micelles et l'absorption intestinale des molécules liposolubles mais ce n'est pas tout. Certains acides biliaires sont capables de moduler l'activité de récepteurs nucléaires comme FXR (Farnesoid X Receptor) et ainsi de contrôler l'expression d'une grande variété de gènes. D'autre part, les acides biliaires peuvent également se lier à un récepteur membranaire TGR5. L'action des acides biliaires *via* FXR et TGR5 a été impliquée dans le métabolisme du glucose et des dizaines d'études ont été publiées à ce sujet. Par exemple, la fixation des acides biliaires sur le récepteur TGR5 exprimé par les cellules entéroendocrines est capable d'induire la sécrétion de GLP-1¹⁹⁶. A l'inverse, l'activation de FXR dans les cellules entéroendocrines diminue la libération de GLP-1¹⁹⁷. Les acides biliaires peuvent donc avoir des effets opposés en fonction du récepteur sur lequel ils se fixent. De plus, tous les acides biliaires ne sont pas capables de se lier aux 2 récepteurs et

l'affinité de chaque acide biliaire pour un récepteur donné est variable¹⁹⁸. Par ailleurs, certains acides biliaires sont capables d'activer FXR et d'autres l'inhibent ce qui rajoute un niveau de complexité dans leur mode d'action. Dès lors, la modification des proportions relatives des différents acides biliaires par le microbiote intestinal peut profondément influencer leurs effets signalisants. Par exemple, le microbiote peut convertir l'acide biliaire T- β MCA (Tauro- β MuriCholic Acid) en β MCA¹¹⁰. Le T- β MCA étant un antagoniste de FXR, sa diminution dans l'intestin peut lever l'inhibition de FXR. De plus, Li Y. *et al.* ont montré que la diminution de la conversion du T- β MCA en β MCA par le microbiote pouvait protéger les souris de l'apparition des maladies métaboliques en inhibant FXR¹⁹⁹. Ces données montrent que le métabolisme des acides biliaires par le microbiote peut influencer le développement des maladies métaboliques.

3) Régulation de la perméabilité intestinale et de l'inflammation au cours des maladies métaboliques

Au cours des maladies métaboliques, la barrière intestinale est altérée à plusieurs niveaux. En effet, une diminution de l'épaisseur du mucus a été constatée chez les souris nourries avec un régime hyperlipidique²⁰⁰ ainsi qu'une détérioration des jonctions serrées²⁰¹⁻²⁰⁴. Cani P.D. *et al.* ont montré que la consommation d'un hyperlipidique s'accompagnait d'une diminution de l'expression des protéines des jonctions serrées comme zonula occludens et occludine²⁰¹. En outre, la rétention de l'occludine dans le cytoplasme des entérocytes de rats obèses a également été observée²⁰², ainsi qu'une distribution anormale de ces protéines chez la souris ob/ob et db/db^{203,204}. En effet, Brun P. *et al.*, ont mis en évidence par immuno-histologie que dans l'iléon des souris obèses, les protéines ZO-1 n'étaient pas réparties sur toute la continuité des jonctions serrées et permettaient ainsi le passage de composés entre les entérocytes. Ces altérations sont rapides et précèdent l'apparition du diabète puisqu'une seule semaine de régime alimentaire hyperlipidique suffit à induire l'augmentation de la perméabilité intestinale²⁰⁵.

Le microbiote intestinal joue un rôle crucial dans l'augmentation de la perméabilité au cours des maladies métaboliques. En effet, un traitement antibiotique visant à éliminer les bactéries intestinales s'oppose à l'augmentation de la perméabilité normalement induite par le régime hyperlipidique²⁰¹. De plus, le traitement des souris ob/ob avec un prébiotique (fibres alimentaires non digestibles stimulant la croissance de certaines bactéries commensales) améliore la fonction de barrière intestinale et limite le développement des désordres métaboliques¹⁹⁰. Enfin, l'utilisation de plusieurs souches de probiotiques (microorganismes vivants ayant des effets bénéfiques sur l'hôte) s'est montrée efficace pour s'opposer à l'augmentation de la perméabilité au cours des maladies métaboliques^{200,205}. En 2012, notre laboratoire a montré que des souris mâles de même fond génétique, du même âge et nourries avec le même régime hyperlipidique ne développaient pas toutes l'intolérance au glucose normalement induite par le régime²⁰⁶. De manière intéressante, les souris tolérantes au glucose avaient un microbiote différent des souris intolérantes et une perméabilité intestinale moins élevée dans l'iléon et le caecum²⁰⁶. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la perméabilité intestinale observée au cours d'un régime hyperlipidique est dépendante des modifications du microbiote intestinal²⁰⁶.

Le système immunitaire intestinal est également fortement impliqué dans la régulation de la perméabilité. Par exemple, lors des maladies inflammatoires intestinales l'activation excessive du système immunitaire est associée à une augmentation de la perméabilité. Dans ces pathologies, l'augmentation de la perméabilité induit le passage de composés microbiens dans la muqueuse intestinale qui stimulent le système immunitaire et entretiennent l'inflammation²⁰⁷. Plusieurs cytokines inflammatoires comme le TNF- α , IFN- γ (InterFéroN- γ) ou IL-1 β sont connues pour induire une augmentation de la perméabilité intestinale en agissant directement sur les entérocytes pour modifier les jonctions serrées²⁰⁸⁻²¹⁰. Au cours du diabète, l'apparition de l'inflammation intestinale associée à une augmentation de perméabilité est encore controversée. En effet, certains articles décrivent l'apparition de l'inflammation intestinale au cours du développement des maladies métaboliques et son rôle causal dans l'hyperperméabilité intestinale est observée²¹⁰⁻²¹². Néanmoins, d'autres équipes de recherche, dont la nôtre, ont observé au contraire une diminution du tonus inflammatoire intestinal au cours des maladies métaboliques²¹³⁻²¹⁵. Ce défaut d'activation du système immunitaire inflammatoire semble affecter les lymphocytes Th17^{214,215} mais également les polynucléaires éosinophiles²¹³. Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par la différence de régime utilisé ou par le segment d'intestin étudié mais également par les différences de microbiote intestinal chez les souris.

La principale conséquence de cette hyperperméabilité intestinale est le passage incontrôlé de composés d'origine procaryote de l'intestin vers le reste de l'organisme. D'ailleurs, plusieurs études ont constaté, chez l'Homme comme chez la souris, une augmentation des taux circulants de LPS au cours des maladies métaboliques^{200,201,205,216}. Chez l'Homme la consommation d'un régime riche en calories corrèle positivement avec les taux sanguins de LPS²¹⁷. En outre, le LPS n'est pas la seule molécule d'origine bactérienne capable de franchir la barrière intestinale au cours des maladies métaboliques. Chez l'Homme la quantité d'ADN bactérien 16S dans le sang des patients est associée à l'augmentation de l'adiposité viscérale et au risque accru de développer un diabète de type 2²¹⁸. De plus, certaines bactéries entières peuvent franchir la barrière intestinale au cours du diabète chez la souris²⁰⁵. L'ensemble de ces constituants bactériens est en partie responsable de l'activation du système immunitaire au cours des maladies métaboliques. En effet, des travaux menés par notre laboratoire en 2007 ont mis en évidence que l'infusion de LPS chez la souris pendant un mois était capable, à elle seule, d'induire la résistance à l'insuline²¹⁶. En plus du LPS, le passage du peptidoglycane (un autre constituant de la paroi bactérienne) peut également stimuler le système immunitaire et conduire à l'inflammation chronique de bas grade caractéristique des maladies métaboliques²¹⁹ (**Figure 21**).

Dès lors, la manipulation du microbiote ou du système immunitaire intestinal dans le cadre du traitement des maladies métaboliques apparaît comme étant une piste thérapeutique prometteuse.

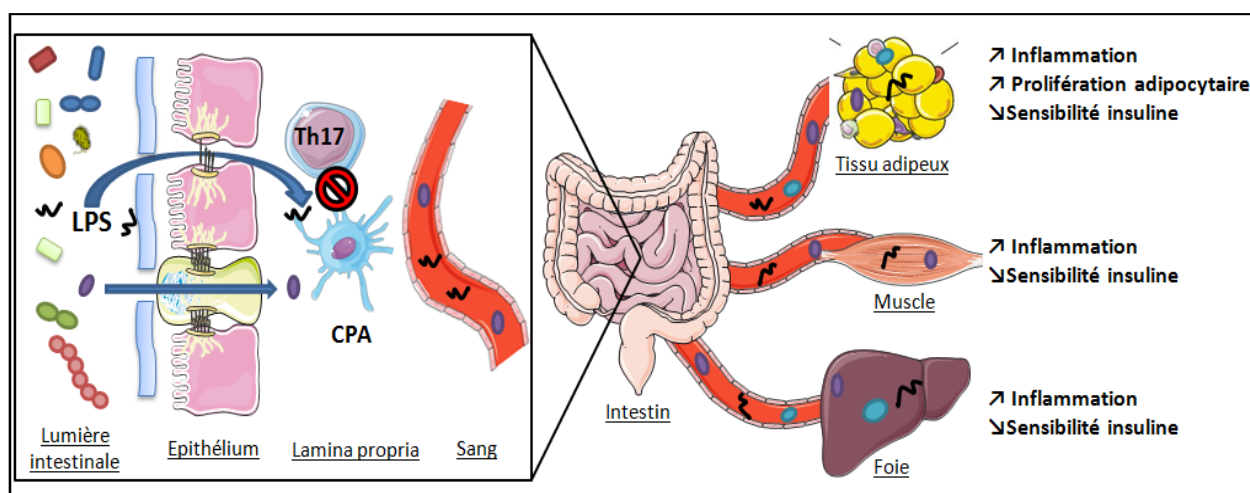


Figure 21: L'origine intestinale de l'inflammation de bas grade caractéristique des maladies métaboliques.

Les maladies métaboliques comme le diabète de type 2 et l'obésité sont caractérisées par une inflammation métabolique chronique et de bas grade. Plusieurs études chez l'Homme et chez la souris ont montré une altération du mucus et des jonctions serrées au cours des maladies métaboliques. L'altération de la barrière intestinale entraîne alors le passage de composés bactériens comme le LPS (en noir) et de bactéries entières (ovales violets ou bleus) dans la lamina propria. Au cours des maladies métaboliques, le système immunitaire intestinal est également défaillant (schématisé par un cercle rouge barré sur le schéma) et il n'est pas capable de faire face à ce flux bactérien. Ces composés vont alors pouvoir circuler dans le sang et générer une inflammation responsable de la diminution de la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques comme le tissu adipeux, le foie et le muscle. LPS: LipoPolySaccharide ; CPA: Cellule Présentatrice d'Antigène ; Th17: Lymphocytes T helper 17.

C. Le microbiote intestinal : une cible thérapeutique pour le traitement des maladies métaboliques ?

1) Les probiotiques et les prébiotiques

L'implication du microbiote intestinal dans les maladies métaboliques a propulsé cet « organe procaryote » au rang de cible thérapeutique. Plusieurs types d'interventions sont envisagées depuis quelques années. Les probiotiques, (microorganismes ayant des effets bénéfiques sur l'hôte), ainsi que les prébiotiques (fibres alimentaires non digestibles stimulant la croissance de certaines bactéries commensales) ont leur place dans toutes les pharmacies.

Chez la souris, plusieurs variétés de souches bactériennes ont été utilisées pour le traitement des maladies métaboliques. De manière très intéressante toutes ces espèces bactériennes n'ont pas le même mode d'action. Par exemple, *Akkermansia muciniphila* est une souche bactérienne naturellement présente dans l'intestin. Lors de l'apparition des maladies métaboliques, la quantité de cette bactérie diminue fortement dans le caecum des souris ob/ob (d'un facteur 1000 comparativement aux souris sauvages) et des souris nourries avec un régime hyperlipidique (d'un facteur 100 comparativement aux souris nourries avec un régime standard). De plus, l'administration de cette souche bactérienne prévient le développement de l'obésité et de la résistance à l'insuline chez la souris nourrie avec un régime hyperlipidique²⁰⁰.

Cette bactérie est capable d'interagir avec le mucus et d'augmenter son épaisseur ce qui limite l'apparition de hyperperméabilité intestinale délétère (**cf partie précédente**). Par ailleurs, dans une étude menée par notre laboratoire, nous avons démontré qu'une autre bactérie *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* 420 était également capable d'améliorer la fonction de barrière intestinale en prévenant la translocation des bactéries intestinales vers les tissus au cours du diabète²⁰⁵. D'autres souches de bactéries comme *Lactobacillus rhamnosus* sont capables de produire des composés métaboliquement actifs, comme l'acide linoléique, qui vont protéger de l'obésité induite par un régime hyperlipidique²²⁰. Par ailleurs, beaucoup d'autres souches ont été utilisées chez la souris pour limiter l'apparition des désordres métaboliques comme *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus pentosaceus*, ou bien encore, *Bacteroides uniformis*²²¹. Chez l'Homme, les études évaluant l'impact des probiotiques sur les maladies métaboliques sont plus rares et les résultats sont moins encourageants. Par exemple, la souche *Lactobacillus acidophilus* a eu des effets mineurs sur la sensibilité à l'insuline de patients diabétiques de type 2 traités quotidiennement avec la bactérie²²².

Les souches bactériennes sont utilisées souvent seules et rarement en cocktail (plusieurs espèces de bactéries administrées en même temps). Néanmoins, l'administration simultanée de plusieurs espèces bactériennes aux modes d'actions complémentaires pourrait potentialiser leurs effets. Dans une étude parue en 2016, un probiotique composé de plusieurs souches bactériennes (des *Lactobacillus* et des *Bifidobacterium*) a été utilisé pour traiter des patients diabétiques. Ces bactéries ont modestement amélioré les taux d'insuline et l'hémoglobine glyquée chez ces patients²²³. En résumé, les effets des probiotiques chez la souris semblent être intéressants pour traiter les maladies métaboliques. Cependant, peu d'études sont menées chez l'Homme et les effets observés sont modestes.

Les prébiotiques sont également utilisés pour moduler le microbiote intestinal et favoriser la prolifération des bactéries aux propriétés bénéfiques. Contrairement aux probiotiques il ne s'agit pas d'introduire des bactéries dans l'intestin mais de nourrir les bactéries qui y sont déjà présentes. Pour être efficace un prébiotique doit remplir plusieurs critères : il doit arriver intact dans les parties distales de l'intestin au contact des bactéries (donc il ne doit pas être absorbé ou digéré), il doit pouvoir être métabolisé par les bactéries et enfin il doit permettre la croissance de souches bactériennes bénéfiques pour l'hôte. De manière générale, les composés répondant à ces 3 critères sont : les fructooligosaccharides, les galactooligosaccharides, le lactulose et les fibres alimentaires non digestibles par l'hôte. De nombreuses études ont démontré les effets bénéfiques des prébiotiques sur les maladies métaboliques aussi bien chez l'Homme que chez la souris²²⁴.

2) La transplantation fécale

Une autre approche permettant de moduler le microbiote intestinal se démocratise depuis quelques années : la transplantation fécale (aussi appelée thérapie fécale). Cette méthode consiste à introduire le microbiote intestinal contenu dans les selles d'un individu sain dans l'intestin d'un individu malade. Cette thérapie a gagné en popularité récemment car elle permet de soigner efficacement les infections intestinales induites par la bactérie *Clostridium difficile* (*C. difficile*). Cette bactérie provoque des diarrhées plus ou moins sévères associées à une

inflammation importante du côlon. La bactérie est présente à l'état de spore dans l'intestin de nombreuses personnes et la présence d'un microbiote fonctionnel s'oppose à sa prolifération. La plupart des cas d'infection à *C. difficile* surviennent chez des patients traités longtemps avec des antibiotiques et dont le microbiote a été partiellement détruit. Dans ces conditions, la bactérie profite de l'absence des bactéries commensales pour proliférer. Depuis quelques années, la recolonisation du tractus digestif par transplantation fécale s'est avérée efficace pour traiter ce type d'infection.

Cette pratique est très courante chez les éleveurs bovins et elle porte le nom de transfaunation²²⁵. Chez la vache, le microbiote est indispensable à la digestion des kilogrammes de fibres alimentaires ingérées chaque jour. Lorsque la digestion est défaillante et que la fermentation n'est plus efficace chez les vaches, les fermiers peuvent réintroduire dans leur intestin, par transfaunation, les bactéries intestinales d'une autre vache en bonne santé. Chez l'Homme, l'idée de repeupler l'intestin d'un sujet malade avec le microbiote d'un sujet sain ne date pas d'hier. Certains articles décrivent que l'utilisation de matière fécale pour le traitement des diarrhées se pratiquait déjà en Chine au 4^{ème} siècle²²⁶. Une autre revue mentionne que durant la seconde guerre mondiale, les soldats allemands combattant en Afrique du Nord se soignaient en ingérant des fèces de chameaux lorsqu'ils étaient victimes de dysenterie²²⁷. Par ailleurs, la première étude de cas utilisant la transplantation fécale pour le traitement des diarrhées a été publiée en 1958²²⁸. Cette pratique est restée marginale et seulement 2 autres articles ont utilisé cette méthode pour traiter les infections à *C. difficile* jusque dans les années 1980^{229,230}. En 1989, Justin D. Bennet, un chercheur américain atteint depuis plusieurs années de colite ulcéreuse, a testé sur lui-même l'effet de la transplantation fécale pour traiter sa maladie²³¹. Il a publié sa propre étude de cas dans *The Lancet* où il décrit qu'il n'a plus de symptômes de la maladie 6 mois après la transplantation et qu'il a pu arrêter tous les traitements qu'il prenait jusqu'à présent. L'auteur précise d'ailleurs que cela faisait 11 ans qu'il n'avait pas vécu sans symptômes²³¹. Par la suite, plusieurs centaines d'études de cas ont vu le jour mais il aura fallu attendre les années 2010 pour que les premiers essais cliniques soient menés.

En 2013, le premier essai clinique a comparé l'efficacité de la transplantation fécale par rapport à la vancomycine pour le traitement de l'infection à *C. difficile*²³². La vancomycine fait partie avec le métronidazole des antibiotiques donnés en première intention pour le traitement des infections à *C. difficile*. Dans cette étude, 81% des patients traités par transplantation fécale ont vu disparaître leurs symptômes contre seulement 31% des patients traités aux antibiotiques. Cette étude s'est terminée précocement car le traitement par transplantation fécale était plus de 2 fois plus efficace que le traitement de référence, ce qui a conduit les auteurs à traiter les patients nouvellement inclus uniquement par transplantation fécale²³². Cet essai clinique a élevé le microbiote fécal au rang de médicament en 2014 (conformément à l'article L. 5111-1 du Code de la Santé publique) dans la mesure où il est utilisé à visée curative à l'égard de maladies humaines.

Les mécanismes par lesquels la transplantation fécale élimine *C. difficile* sont encore méconnus mais l'analyse des acides biliaires pourrait donner des éléments de réponses. Dans une étude publiée en 2015, Buffie C.G. *et al.* ont constaté que les souris les plus sensibles à l'infection à *C. difficile* étaient celles qui possédaient la plus faible quantité de la souche bactérienne *Clostridium scindens*²³³. De plus, le traitement des souris avec *Clostridium scindens* s'oppose à la colonisation de l'intestin par *C. difficile* et protège de la maladie. En se penchant sur les fonctions exercées par *Clostridium scindens* les auteurs ont observé que cette bactérie est

capable de déconjuguer les acides biliaires primaires pour produire l'acide désoxycholique (un acide biliaire secondaire)²³³. Les auteurs ont par la suite démontré que cet acide biliaire secondaire est capable d'inhiber la croissance de *C. difficile* *in vitro* et que sa production *in vivo* protège les souris de l'infection à *C. difficile*. Dans une autre étude, Weingarden A.R. *et al.* ont mis en culture des souches bactériennes de *C. difficile* isolées des selles de patients atteints de la maladie avant qu'ils ne soit traités par transplantation fécale. Les auteurs ont ensuite rajouté au milieu de culture les acides biliaires présents dans les selles des patients avant et après la transplantation²³⁴. De manière intéressante, la croissance de *C. difficile* a été inhibée uniquement en présence des acides biliaires présents après la transplantation. L'analyse des acides biliaires avant et après la transplantation a permis de montrer que cette procédure induit une forte augmentation de la quantité d'acides biliaires secondaires (dont l'acide désoxycholique). Autrement dit, ces études suggèrent que les bactéries apportées par le transplant pourraient métaboliser différemment les acides biliaires et produire des acides biliaires secondaires capables d'inhiber la croissance de *C. difficile*.

En 2015, 2 essais cliniques ont évalué pour la première fois l'effet de la transplantation fécale sur la colite ulcéreuse (une maladie inflammatoire de l'intestin)^{235,236}. Dans le premier essai de Moayyedi P. *et al.*, la rémission des symptômes a été observée chez 24% des patients traités par transplantation fécale contre 5% chez les patients ayant reçu le placebo²³⁵. Dans l'autre essai clinique conduit par Rossen N.G. *et al.*, les patients transplantés ont été comparés à des patients ayant reçu leurs propres fèces²³⁶. Dans ce cas, la rémission de symptômes a été observée pour 30,4% des patients ayant reçu le microbiote d'un donneur sain contre 25% pour les patient auto-transplantés (les différences ne sont pas significatives entre les 2 groupes). A la lumière de ces 2 essais cliniques il paraît légitime de se demander pourquoi les résultats semblent contradictoires. Un premier élément de réponse peut venir du contrôle utilisé. En effet, dans l'essai clinique mené par Rossen N.G. *et al.*, le groupe de patients témoins est un groupe de patients auto-transplantés. Or, la rémission de la maladie a été constatée chez 25% de ces patients témoins. Dans l'étude effectuée par Moayyedi P. *et al.*, les patients témoins n'ont pas été transplantés et une rémission spontanée a été observée seulement chez 5% des patients. La comparaison de ces 2 groupes témoins semble suggérer que l'inoculation de son propre microbiote par auto-transplantation pourrait favoriser la guérison de la colite ulcéreuse. D'autre part, le protocole de transplantation utilisé par les 2 études n'est pas le même. Dans la première étude, les patients sont traités par voie basse (coloscopie) 1 fois par semaine pendant 6 semaines. Dans le deuxième essai clinique, les patients reçoivent 2 transplants à 3 semaines d'intervalle par voie haute à l'aide d'une sonde naso-duodénale. Par ailleurs, cette absence d'homogénéisation des protocoles de transplantation fécale témoignent d'une pratique encore récente qui a besoin d'être standardisée.

En pratique, les selles d'un donneur sain (souvent un proche de la famille) sont dissoutes dans du sérum physiologique de telle sorte à re-suspendre les bactéries. La quantité de selles utilisée n'est pas vraiment standardisée et la plupart des études utilise environ 50 grammes²³⁷. La préparation est filtrée (pour éliminer les fragments de régime et les autres composés non digérés) à l'aide d'un filtre rudimentaire comme une compresse de gaz ou même un filtre à café stérilisé²³⁸. Ensuite, la suspension bactérienne est administrée au patient soit par voie basse (coloscopie), soit à l'aide d'une sonde naso-gastrique ou naso-duodénale. La deuxième voie d'administration a l'avantage d'être moins invasive pour le patient car elle ne nécessite pas d'anesthésie (**Figure 22**). Dans une étude pilote sur 20 patients atteints d'une infection à *C.*

difficile Younster I. *et al.* ont évalué si l'efficacité de la transplantation fécale était affectée par la voie d'administration²³⁹. Les 20 patients ont été répartis en 2 groupes, l'un transplanté par coloscopie et l'autre par sonde naso-gastrique. Dans le groupe traité par voie basse, 8 patients sur 10 ont été guéris dès la première transplantation contre 6 patients sur 10 pour le groupe traité par sonde naso-gastrique. Cinq des 6 patients réfractaires ont été re-transplantés une deuxième fois par la même voie que lors du premier traitement et 4 ont été guéris²³⁹. Dans cette étude, le nombre de patients restreint n'a pas permis de mettre en évidence une variation significative entre l'efficacité des 2 procédures utilisées. Au-delà de la voie d'administration variable, le nombre de transplantations et la durée entre chaque transplantation ne sont pas encore bien définis et plusieurs protocoles peuvent être utilisés. Pour les infections à *C. difficile*, une procédure type semble se dégager : une première transplantation a lieu et permet la guérison d'environ 80-90% des patients. Les patients réfractaires au traitement sont transplantés une deuxième fois ce qui permet de dépasser les 90% de guérison²³⁸. Pour le traitement d'autres maladies inflammatoires de l'intestin le nombre d'inoculation peut monter jusqu'à 6 transplantations en 6 semaines²³⁵. Cette «procédure artisanale» pourrait être remplacée prochainement par des gélules de microbiote fécal. En effet, une équipe américaine a conçu ce type de pilules qui, une fois ingérées, semble aussi efficaces que la transplantation classique pour traiter l'infection à *C. difficile*²⁴⁰.

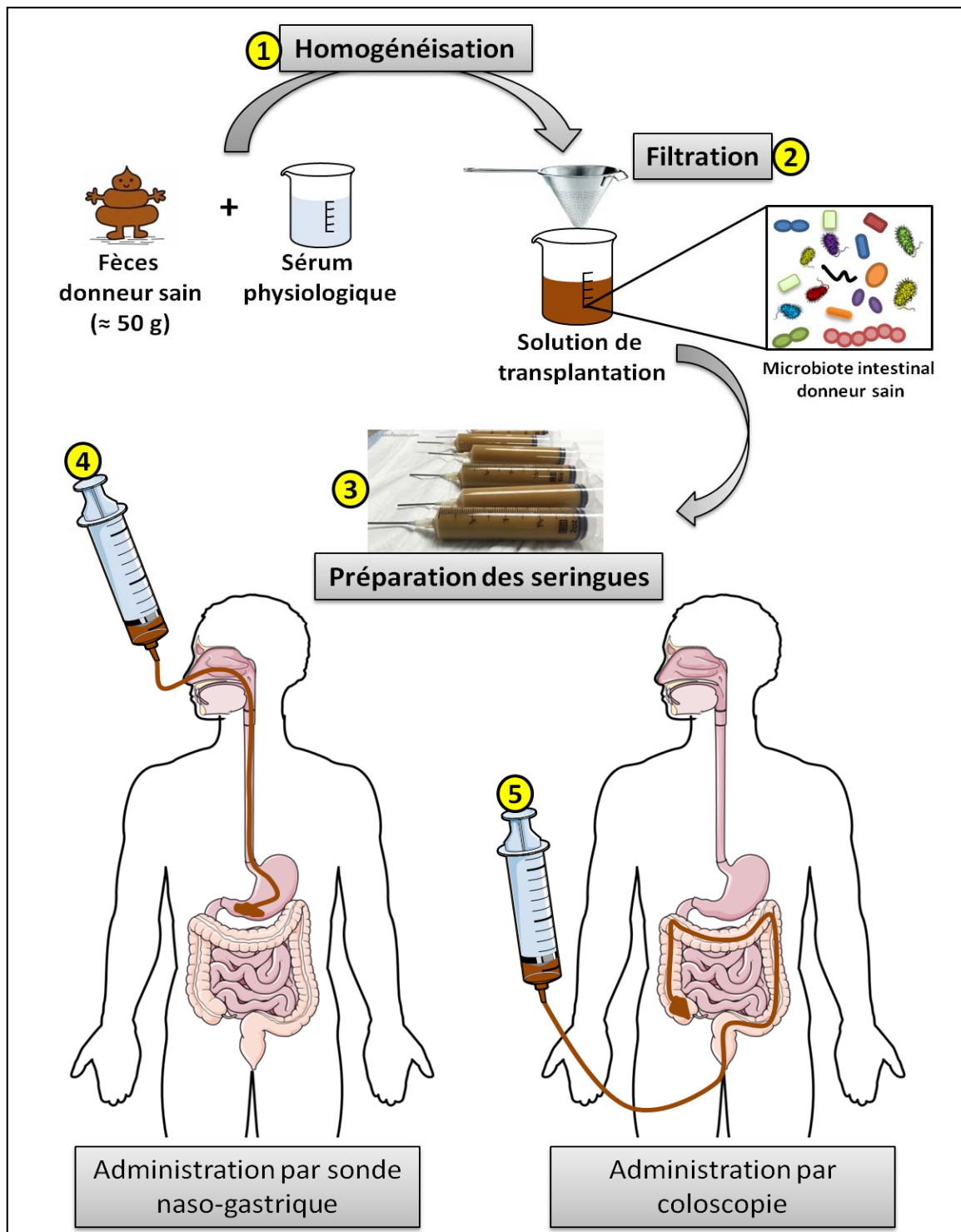


Figure 22: La procédure de transplantation fécale.

- 1- La procédure d'homogénéisation des fèces n'est pas standardisée. De manière générale environ 50 g de fèces issus d'un donneur sain sont dissous dans du sérum physiologique afin de re-suspendre les bactéries intestinales contenues à l'intérieur.
- 2- L'homogénat fécal est ensuite filtré pour éliminer les débris de régime non digérés (le filtre est perméable aux bactéries).
- 3- La solution de transplantation est conditionnée dans des seringues.
- 4- L'administration de la solution de transplantation chez le patient peut se faire à l'aide d'une sonde naso-gastrique. Cette procédure ne nécessite pas d'anesthésie.
- 5- L'administration peut également être effectuée par voie basse directement dans le côlon. Cette procédure nécessite une anesthésie.

Les maladies inflammatoires intestinales ne sont pas les seules maladies qui pourraient bénéficier de la transplantation fécale. Il serait d'ailleurs intéressant de regarder l'effet de cette procédure sur l'ensemble des maladies associées à une dysbiose du microbiote intestinal comme les maladies métaboliques. D'ailleurs, un essai clinique a utilisé la thérapie fécale chez des patients diabétiques²⁴¹. Cet essai a été effectué sur peu de patients tous résistants à l'insuline. Neuf patients ont reçu le microbiote de personnes non malades et 6 patients ont reçu leur propre microbiote. Le transfert du microbiote intestinal d'une personne mince a permis d'augmenter la sensibilité à l'insuline de 5 des 9 patients diabétiques transplantés. Cet effet métabolique est prometteur et suggère que la transplantation fécale pourrait être utilisée dans le cadre du traitement du diabète. Néanmoins, le faible nombre de patients rend difficile son interprétation.

Il existe une multitude de protocoles de transplantation différents effectués chez les animaux de laboratoire et presque chaque laboratoire à son propre protocole. Toutes ces procédures peuvent être regroupées en 4 grands groupes : le cohabitat (cohousing), l'adoption croisée (cross-fostering), la transplantation par gavage précédée d'un traitement antibiotique (1 ou plusieurs gavages, volume de gavage différents et traitements antibiotiques préalables variables entre les études) et la transplantation par gavage sans traitement préalable (1 ou plusieurs gavages, mise à jeun ou non des souris, volume et concentration du transplant variables). En plus de ces 4 méthodes, le choix de l'origine du microbiote peut varier. En effet, certaines études choisissent de transplanter le microbiote fécal, et d'autres, le microbiote contenu dans le caecum ou l'iléon.

Le cohabitat est la méthode la plus simple pour transférer le microbiote d'un groupe de rongeurs à l'autre. Elle repose sur un constat simple : les rongeurs sont coprophages (ils mangent leurs fèces). Comme les fèces produites par les rongeurs restent dans la litière plusieurs jours en moyenne, il suffit de mettre dans la même cage 2 groupes de rongeurs aux microbiotes différents. Les rongeurs se mangeront les fèces entre eux et le microbiote fécal d'un groupe sera alors transféré à un autre groupe et inversement. Cette technique a été employée dans de nombreux articles et l'équipe américaine de Richard A. Flavell l'a utilisée lors de ses travaux sur l'inflammasome^{242,243}. L'inflammasome est un complexe protéique qui est activé en réponse à un stimulus inflammatoire. Les auteurs ont démontré que les souris invalidées pour différentes protéines de cet inflammasome avaient un microbiote différent des souris sauvages. De plus, ces souris étaient plus sensibles au développement de la colite et de la stéatose hépatique^{242,243}. Lorsque les auteurs ont fait cohabiter des souris invalidées et des souris sauvages, ils ont constaté que les souris sauvages développaient la colite et la stéatose hépatique. Ils ont pu confirmer que, lors de la cohabitation, le microbiote intestinal des souris invalidées colonisait l'intestin des souris sauvages et conduisait à l'apparition des symptômes.

La méthode d'allaitement croisé est plus difficile à mettre en place. Elle consiste à faire adopter à une mère la portée d'une autre. Nous avons vu dans la 1^{ère} partie de l'introduction que l'acquisition du microbiote commence à la naissance et que la mère et son environnement jouent un rôle fondamental dans ce processus. Par conséquent, l'environnement microbien de la mère peut être transféré à la portée qu'elle allaite. Garrett W.S. *et al.* ont utilisé cette méthode à plusieurs reprises^{90,91}. Les auteurs ont développé un modèle de souris génétiquement modifiées qui développent spontanément une colite très sévère (souris TRUC pour T-bet-/- × RAG2-/-, Ulcerative Colitis ; T-bet : T-box expressed in T cells ; RAG2 : Recombination-Activating Gene 2). Lorsque des souris sauvages (qui ne développent pas naturellement de colite) sont élevées par

une mère TRUC invalidée, elles vont développer à leur tour une colite. Les auteurs ont pu montrer que la transmission du phénotype était induite par le transfert du microbiote de la mère à l'enfant.

Les méthodes de cohabitation et d'allaitement croisé semblent efficaces pour transférer le microbiote intestinal d'une souris à l'autre. Cependant, il semble difficile de concevoir que ces méthodes ne transfèrent que des bactéries. La souris est un animal social et la cohabitation peut entraîner des phénomènes de stress ou l'établissement d'une hiérarchie entre les souris qui peuvent être des facteurs confondants. Les méthodes de transfert de microbiote par gavage (qui évite tout contact physique entre l'animal donneur et le receveur) paraissent alors moins biaisées et plus contrôlées. Les méthodes de transplantation par gavage peuvent être précédées d'un traitement antibiotique administré aux souris receveuses. L'utilité de ce prétraitement est encore débattue au sein de la communauté scientifique. Lorsqu'ils sont utilisés, les antibiotiques sont censés détruire une grande partie du microbiote endogène et ainsi de libérer des niches écologiques qui pourront être occupées par les bactéries du transplant. Par exemple, Schulz M.D. *et al.* ont prétraité des souris pendant une semaine avec un cocktail d'antibiotiques dissous dans l'eau de boisson (vancomycine, néomycine, métronidazole, ampicilline)²⁴⁴. Ensuite, les auteurs ont gavé les souris avec le microbiote fécal de souris obèses diabétiques. Dans une autre étude récente, Benakis C. *et al.* ont prétraité les souris pendant seulement 3 jours avec un seul type d'antibiotique (amoxicilline-acide clavulanique) et gavé une seule fois les souris avec un mélange de contenu caecal d'autres souris²⁴⁵. La grande majorité des études utilisent le prétraitement antibiotique sans pour autant que son utilité ne soit clairement démontrée. Un article publié en 2010 tend même à démontrer le contraire²⁴⁶. Les auteurs ont comparé l'efficacité de la transplantation d'un microbiote caecal chez des rats traités aux antibiotiques et des rats non traités. Comme attendu, le traitement antibiotique a détruit une grande partie du microbiote. Néanmoins, l'implantation du microbiote exogène a été moins efficace lorsque le rat a été traité aux antibiotiques au préalable. D'ailleurs, d'autres études n'ont pas utilisé de prétraitement antibiotique. Par exemple Ji Y. *et al.* ont gavé les souris 2 fois par semaines pendant 3 semaines avec une suspension de microbiote fécal sans prétraitement²⁴⁷.

Quelle que soit la procédure utilisée, la transplantation induit des modifications taxonomiques du microbiote. Cependant, il n'est pas encore déterminé si les bactéries du donneur s'implantent et cohabitent avec les bactéries présentes dans l'intestin du receveur. Par ailleurs, chaque individu possède son propre microbiote et il est possible que l'efficacité de la procédure puisse dépendre des bactéries présentes dans l'intestin du receveur au moment de la transplantation. Une étude récente a fourni quelques éléments de réponse à ces questions²⁴⁸. Les auteurs ont transplanté 5 sujets sains non traités aux antibiotiques avec un microbiote provenant d'un autre sujet sain. Les auteurs ont identifié les SNP (SNP, Single-Nucleotide Polymorphism) présents dans le génome de l'ensemble des bactéries contenues dans le transplant et dans le microbiote des sujets avant et après la transplantation. Les SNP sont des variations d'un seul nucléotide à un endroit précis du génome d'une même espèce. Ici l'étude des SNP permet donc de distinguer le génome de 2 bactéries appartenant à la même espèce. Grâce à cette analyse les auteurs ont pu déterminer si les génomes bactériens isolés des sujets après la transplantation possédaient des SNP retrouvés dans le transplant ou des SNP déjà présents dans leur intestin. Les auteurs ont mis en évidence que plusieurs des espèces présentes dans le transplant cohabitaient avec des espèces déjà présentes dans l'intestin des receveurs jusqu'à 3 mois après la transplantation²⁴⁸. De plus, les auteurs ont constaté que les espèces capables de

s'implanter dans l'intestin du receveur étaient des espèces déjà présentes avant la transplantation. Par exemple, la souche bactérienne *Roseburia hominis* est présente dans le transplant et possède des SNP caractéristiques sur son génome. Cette bactérie c'est implantée dans 4 des 5 patients transplantés qui possédaient déjà la souche bactérienne *Roseburia hominis* dans leur intestin. En revanche, cette bactérie ne s'est pas implantée chez le dernier patient qui ne possédait pas cette souche bactérienne avant la transplantation. D'autre part, les auteurs ont constaté une grande variabilité du degré d'implantation des espèces chez les 5 sujets transplantés ce qui suggèrent que des facteurs propres aux receveurs conditionnent l'efficacité du transfert²⁴⁸. En effet, 3 mois après la transplantation 2 patients ont presque 50% de leur microbiote composé d'espèces appartenant au donneur alors que chez les 3 autres ce pourcentage est réduit à environ 10%.

La transplantation fécale consiste à inoculer un homogénat de selles (ou de contenu intestinal). Dès lors, il faut avoir conscience que bien d'autres choses sont transférées et pas uniquement les bactéries intestinales. Le contenu d'un transplant contient également des virus, des champignons, des acides biliaires secondaires, des micros ARN et pleins d'autres métabolites divers et variés. Ces composés ne sont pas encore considérés avec précision même si récemment Chehoud C. *et al.* ont montré que la communauté virale du donneur pouvait être transférée au receveur de microbiote fécal²⁴⁹.

Objectifs des travaux de thèse

L'intestin contient un grand nombre de microorganismes connus sous le nom de microbiote intestinal. Dans le cæcum et le côlon, cet écosystème complexe est composé de plus de 10^{14} bactéries par gramme de contenu intestinal. Comme nous l'avons détaillé dans l'introduction ces bactéries jouent un rôle central dans le métabolisme énergétique de l'hôte. Par ailleurs, plusieurs études ont montré que certaines pathologies comme le diabète et l'obésité sont caractérisées par des altérations taxonomiques et fonctionnelles du microbiote intestinal. Autrement dit, les Hommes ainsi que les souris obèses et diabétiques ont un microbiote différent des Hommes et des souris minces. De plus, la colonisation de souris axéniques (*i.e.* dépourvues de microbiote) par ce microbiote intestinal différent est suffisante pour induire la maladie. Ces résultats suggèrent que les modifications du microbiote intestinal retrouvées chez les patients et les souris obèses/diabétiques sont potentiellement impliquées dans le développement de cette pathologie. **Néanmoins, les composantes bactériennes précises et les acteurs moléculaires mis en jeu lors de cette altération métabolique ne sont pas encore clairement identifiés.** Par ailleurs, l'apparition de traits caractéristiques des maladies métaboliques chez des souris axéniques simplement colonisées avec un microbiote issu d'autres souris atteintes d'obésité et de diabète, laisse penser que l'obésité et le diabète sont des maladies d'origine bactériennes et transmissibles d'un individu à l'autre.

Durant ces 10 dernières années, la souris axénique est devenue le modèle de choix pour étudier les fonctions du microbiote sur la physiologie d'un organisme intégré. Ce modèle est particulièrement utilisé quand des modifications du microbiote sont suspectées d'être en partie liées à des modifications physiologiques. Néanmoins, l'absence de microbiote intestinal chez les souris axéniques induit des altérations structurelles et fonctionnelles de l'intestin comme une hyperperméabilité intestinale ou un système immunitaire atrophié. Dans ces conditions, il est possible de se demander si les effets induits par la colonisation des souris axéniques avec un microbiote modifié peuvent être observés chez des souris conventionnelles.

Lors de ma thèse, nous avons voulu déterminer si le transfert d'un microbiote issu de souris obèses/diabétiques était capable de déréguler le métabolisme énergétique d'une souris conventionnelle (*i.e.* qui possède son propre microbiote intestinal). Pour répondre à cette question nous avons développé un nouveau protocole de transfert de microbiote intestinal dans un modèle de souris conventionnelles. Nous avons transféré le microbiote contenu dans le caecum de souris obèses (« microbiote obèse ») et celui contenu dans le caecum de souris minces (« microbiote mince ») dans des souris conventionnelles non traitées aux antibiotiques. Ce modèle de transplantation pourra nous permettre d'identifier des bactéries intestinales et des fonctions bactériennes impliquées dans le développement des maladies métaboliques.

Matériels et méthodes

Animaux

Les souris utilisées dans cette étude sont des souris mâles C57Bl/6J (Charles River, France). Elles ont été élevées avec un accès libre à l'eau et à la nourriture dans un environnement contrôlé (22 °C cycle inversé jour/nuite de 12 heures avec extinction de la lumière à 10 heures). A leur arrivée, tous les animaux ont eu une période d'acclimatation de 2 semaines avant le début de l'expérimentation.

Transfert du microbiote caecal

Plusieurs groupes de souris donneuses de microbiote ont été utilisés.

- Des souris sauvages donneuses de microbiote C57Bl/6J ont été nourries avec un régime normal (12% de lipides, 28% de protéines, et 60% de glucides; A04, Villemoisson sur Orge, France) et sacrifiées en condition nourrie à l'âge de 20 semaines.
- Des souris obèses donneuses de microbiote C57Bl/6J ob/ob ont été nourries avec un régime normal (12% de lipides, 28% de protéines, et 60% de glucides; A04, Villemoisson sur Orge, France) et sacrifiées en condition nourrie à l'âge de 11 semaines (OM(ob) ; avec OM pour Obese Microbiota et ob pour ob/ob).
- Des souris sauvages donneuses de microbiote C57Bl/6J âgées de 8 semaines ont été nourries pendant 3 mois avec un régime hyperlipidique (60% de lipides, 20% de glucides, 20% de protéines, Research Diet #D12492) et sacrifiées en condition nourrie à l'âge de 20 semaines (OM(HFD) ; avec OM pour Obese Microbiota et HFD pour High Fat Diet).

Pour le **protocole #1**, les souris receveuses sauvages et conventionnelles (Conv) étaient âgées de 6 semaines lors du transfert de microbiote caecal et nourries avec un régime normal. Pour ce premier protocole nous avons 3 groupes d'études : des souris ayant reçu le « microbiote obèse OM(HFD) » (groupe Conv + OM(HFD)), des souris ayant reçu le « microbiote mince LM » (groupe Conv + LM) et des souris contrôles non transplantées (groupe Conv + PBS avec PBS pour Phosphate Buffered Saline). Trois semaines après le transfert de microbiote caecal, des analyses métaboliques ont été effectuées chez les souris receveuses. Les souris ont été sacrifiées après 6 heures de jeûne et les différents organes ont été prélevés et congelés dans l'azote liquide.

Pour le **protocole #2**, les souris receveuses sauvages et conventionnelles étaient âgées de 6 semaines lors du transfert de microbiote caecal et nourries avec un régime normal. Pour ce second protocole nous avons 3 groupes d'études : des souris ayant reçu le « microbiote obèse OM(HFD) » (groupe Conv + OM(HFD)), des souris ayant reçu le « microbiote obèse OM(ob) » (groupe Conv + OM(ob)) et des souris contrôles non transplantées (groupe Conv + PBS). Trois semaines après le transfert de microbiote caecal, les souris receveuses ont été nourries avec un régime hyperlipidique (72% de lipides, 28% de protéines et moins de 1% glucides, SAFE, Augy, France). Après 6 semaines de régime hyperlipidique, les souris receveuses ont été sacrifiées après 6 heures de jeûne et les différents organes ont été prélevés et congelés dans l'azote liquide.

Les souris donneuses ont été sacrifiées en condition nourrie par dislocation cervicale. Le caecum a été prélevé rapidement et pesé. Le contenu caecal de 3 à 6 souris donneuses a été extrait et homogénéisé sous hotte dans du PBS (Phosphate Buffered Saline) anaérobie et stérile (N₂ et acide thioglycolique 1 : 2000, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) pour une concentration finale de 200 mg/mL. 200 µL de cette suspension caecale ont été administrés par gavage aux souris receveuses, en condition nourrie. L'ensemble de cette procédure a été répétée une semaine après le premier gavage. La suspension de gavage n'a donc jamais été congelée et chaque gavage a été effectué à partir de nouveaux donneurs de microbiote.

Les souris receveuses n'ont jamais été traitées aux antibiotiques. Le groupe de souris contrôles non transplantées a été gavé à 2 reprises avec du PBS anaérobie et stérile.

Transfert du microbiote fécal

Deux groupes de souris donneuses de microbiote fécal ont été utilisés. Le prélèvement des fèces n'a pas nécessité le sacrifice des souris donneuses.

- Des souris donneuses de microbiote C57Bl/6J ont été nourries avec un régime normal (12% de lipides, 28% de protéines et 60% de glucides; A04, Villemoisson sur Orge, France) (LM pour Lean Microbiota).

- Des souris donneuses de microbiote C57Bl/6J âgées de 8 semaines ont été nourries pendant 14 semaines avec un régime hyperlipidique (60% de lipides, 20% de glucides, 20% de protéines ; Research Diet #D12492) (OM(HFD) ; avec OM pour Obese Microbiota et HFD pour High Fat Diet).

Quatre groupes de 5 **souris receveuses mâles obèses/diabétiques** ont été utilisés. Les souris, âgées de 8 semaines, ont été nourries pendant 14 semaines avec un régime hyperlipidique (60% de lipides, 20% de glucides et 20% de protéines ; Research diet #D12492). Ensuite ces souris HFD (HFD pour High Fat Diet) ont reçu le microbiote fécal des souris donneuses nourries sous régime normal (groupe HFD + LM) ou le microbiote d'un autre groupe de souris nourries avec un régime hyperlipidique (groupe HFD + OM(HFD)). Deux groupes contrôles ont été utilisés: des souris ayant reçu leur propre microbiote fécal (groupe HFD (Auto)) et des souris gavées avec du PBS réduit et stérile (groupe HFD + PBS). Les souris n'ont jamais été traitées aux antibiotiques et le microbiote fécal a été administré par gavage tous les jours pendant 5 jours consécutifs (volume de gavage 200 µL à une concentration de 80 mg de fèces par mL de suspension). Les suspensions microbiennes n'ont jamais été congelées et des fèces fraîches ont été prélevées chaque jour juste avant le transfert de microbiote fécal pour préparer la suspension de gavage.

Mise en culture des suspensions bactériennes de gavage

Après le gavage, les suspensions bactériennes ont été diluées en séries et 100 µL de chaque dilution ont été étalés sur un milieu de culture solide en duplicat (milieu Brucella Agar enrichi en hémine, ménadione et sang de mouton). Les bactéries ont ensuite été cultivées à 37 °C en conditions aérobie et anaérobie pendant 3-5 jours et le nombre de colonies par boîte a été dénombré. Les résultats ont été exprimés en CFU (Colony-Forming Unit) pour 100 µL de suspension de gavage.

Quantification des protéines par western blot

L'extraction et l'analyse des protéines hépatiques par western blot ont été réalisées comme décrites précédemment²⁰⁶. Environ, 100 mg de foie ont été broyés et les protéines ont été extraites dans du tampon de lyse (PerkinElmer) supplémenté avec un inhibiteur des protéases et des phosphatases (cOmplete ; Roche life science). Les protéines extraites ont été dosées par la méthode de Bradford et 30 µg de protéines contenues dans chaque échantillon ont été séparés par l'électrophorèse sur un gel d'acrylamide à 8% (migration pendant 90 minutes à une tension de 80-100V). Ensuite, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham-Protran ; GE Healthcare life science). La vérification du transfert a été effectuée par la coloration des protéines au rouge ponceau et la membrane a été coupée en deux parties : une partie contenant la protéine d'intérêt et une partie contenant la protéine de ménage (la β -actine). Les membranes ont été placées 1 heure dans un tampon de saturation (5% ABS (Albumine de Sérum Bovin) diluée dans du TBS-tween (Tris-buffered saline ; 0,1% tween ; pH=7,4) puis incubées 12 heures à 4 °C avec l'anticorps primaire (dilution au 1 : 5000 dans une solution de 3% ABS diluée dans du TBS-tween). Les anticorps dirigés contre les substrats de la PKA (Protéine Kinase A); la β -actine, la PEPCCK (PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase) et la G6Pase (Glucose-6-Phosphatase) proviennent de Cell Signalling Technology. La membrane a ensuite été rincée et incubée avec un anticorps secondaire anti lapin pendant 1 heure (dilution au 1 : 8000 dans une solution de 3% ABS diluée dans du TBS-tween). Les protéines ont été détectées par chimioluminescence à l'aide de la solution Clarity (Bio-RAD) et les photos des membranes ont été prises avec la caméra ChemiDoc MP (Bio-RAD). La quantification des bandes a été effectuée à l'aide du logiciel Image Lab (Bio-RAD). L'intensité de chaque bande d'intérêt a été normalisée par l'intensité de la bande de la β -actine (la protéine de ménage).

Test de tolérance au glucose

Après 6 heures de jeun, les souris ont reçu un gavage de glucose (2 mg/g) au temps 0 minute. La glycémie a été mesurée à -30, 0, 15, 30, 60, 90 et 120 minutes.

Test de tolérance au pyruvate

Après 6 heures de jeun, les souris ont reçu une injection intra-péritonéale d'une solution de pyruvate (pH=7,4), au temps 0 minute, à une dose de 2 mg/g. La glycémie a été mesurée à -15, 0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes.

Lors des 2 tests de tolérance décrits ci-dessus, la glycémie a été mesurée à l'aide d'un glucomètre (Accu-Check performa, Roche Diagnostic) dans une goutte de sang d'environ 5 µL prélevée à la veine caudale.

Dosage du glycogène hépatique

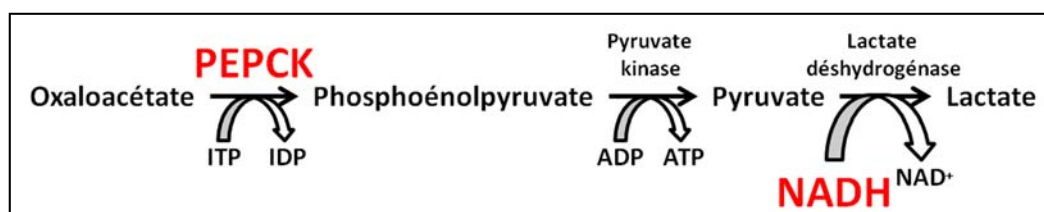
50-100 mg de foie ont été dissous dans 200 µL de NaOH 1M à 55°C pendant 1 heure. Les homogénats ont été neutralisés avec 200 µL de HCl 1N et centrifugé à 7000 rpm pendant 5 minutes à 4 °C. Ensuite, pour hydrolyser le glycogène, 10 µL du surnageant ont été incubés avec 40 µL d'une solution d'amyloglucosidase de 50 U/mL (Sigma) diluée dans une solution d'acétate de sodium (0.2 M ; pH 7,4). Comme tubes témoins, 10 µL de surnageant ont été incubés avec le tampon d'acétate de sodium sans amyloglucosidase. Les tubes ont été incubés 1 heure à 55 °C sous agitation. La concentration en glucose a été mesurée avec le réactif Glucose GOD FS (DiaSys

Diagnostic Systems GmbH) conformément aux instructions du fournisseur. La différence entre la quantité de glucose mesurée entre la condition avec et sans amyloglucosidase reflète le contenu hépatique en glycogène. Le glycogène a été exprimé en µg de glucose issu de l'hydrolyse du glycogène/mg de foie.

Mesure des activités enzymatiques hépatiques

Les mesures des activités enzymatiques ont été effectuées en collaboration avec le Pr. C. Knauf et avec l'aide du Dr. A. Fournel. L'activité de la G6Pase (Glucose-6-Phosphatase) a été mesurée comme décrit dans cet article²⁵⁰. La G6Pase catalyse la réaction suivante : Glucose-6-Phosphate + H₂O → Glucose + Phosphate inorganique. Le principe de ce dosage repose sur la mesure par spectrophotométrie des phosphates inorganiques générés lors des réactions de déphosphorylation. 100 mg de foie ont été broyés et l'activité enzymatique a été mesurée dans le surnageant. Pour chaque échantillon, nous avons mesuré la déphosphorylation du β-glycérophosphate (qui reflète l'activité phosphatase non spécifique présente dans l'échantillon) et la déphosphorylation du glucose-6-phosphate total effectuée par la G6Pase et les autres phosphatases non spécifiques du substrat. L'activité spécifique de la G6Pase a été obtenue par soustraction de l'activité phosphatase non-spécifique, à l'activité G6Pase totale obtenue par hydrolyse du Glucose-6-Phosphate. Les résultats ont été exprimés en µmol de produit formé par minute et par g de foie.

L'activité de la PEPCK (PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase) a été déterminée avec la méthode de Pogson et Smith²⁵¹. 100 mg de foie ont été broyés et l'activité enzymatique a été mesurée dans le surnageant. Le principe de ce dosage enzymatique repose sur la mesure par spectrophotométrie de la disparition de NADH selon la cinétique enzymatique suivante :



Plus la disparition du NADH présent dans la solution est rapide, plus l'activité enzymatique de la PEPCK est importante. Les résultats ont été exprimés en nmol de NADH consommée par minute et par g de foie.

Analyse métabolomique du plasma

50 µL de plasma issus de chaque souris d'un même groupe ont été mélangés et l'analyse métabolomique a été effectuée sur ce mélange de plasma. Les résultats représentés reflètent donc les moyennes de chaque groupe de souris. L'analyse a été effectuée par la technique de spectroscopie RMN (RMN pour Résonance Magnétique Nucléaire) en collaboration avec la plateforme de métabolomique de Toulouse (MetaToul-AXIOM - Plateforme de Métabolomique et de Chimie Analytique en Toxicologie basée sur le site TOXALIM, centre INRA de Toulouse).

Analyse microarray

L'analyse de l'expression des gènes hépatiques a été effectuée avec l'aide de la plateforme Get-TRiX (GénoToul, Génopole Toulouse Midi-Pyrénées). Les listes des gènes exprimés différemment entre les groupes Conv + OM(HFD) et Conv + PBS et entre les groupes Conv + LM et Conv + PBS ont été représentées grâce au logiciel STRING (<http://string-db.org/>). STRING est un logiciel capable de prédire les interactions entre les gènes. Pour notre étude, nous avons paramétré STRING pour mettre en évidence uniquement certains types d'interactions. La liaison de 2 gènes sera effectuée par le logiciel si les noms des gènes apparaissent fréquemment dans les mêmes articles répertoriés dans pubmed, si les gènes sont co-exprimés chez la souris, si les protéines codées par ces gènes interagissent entre elles ou si les gènes sont impliqués dans la même voie métabolique ou la même voie de signalisation. Chaque gène est représenté sur le graphique par une sphère et l'épaisseur des traits reliant les sphères reflète le degré d'interaction entre les gènes.

Mesure des triglycérides hépatiques

Le dosage des triglycérides a été effectué sur un morceau de foie congelé d'environ 50 mg. Le foie a été broyé dans du PBS stérile (Sigma) et les triglycérides ont été extraits de 50 µL d'homogénat grâce à l'ajout de 450 µL d'éthanol absolu (Sigma). Les dosages du glycérol libre et des triglycérides totaux ont été effectués à l'aide des réactifs de chez Sigma (Free Glycerol reagent F6428 et Triglycerides reagent T2449) par spectrophotométrie (lecture à 540 nm). La concentration de triglycérides est obtenue en soustrayant la concentration de glycérol libre à celle de glycérol total.

Dosages biochimiques plasmatiques

Le sang a été prélevé dans la veine cave lors du sacrifice. Le plasma a été obtenu par une centrifugation 5 minutes; 4 °C; 8000 rpm. Les dosages des transaminases (ALT pour Alanine aminoTransférase, AST pour ASpartate aminoTransférase), du cholestérol total, des lipoprotéines (HDL pour Lipoprotéines à haute densité, LDL pour Lipoprotéines à faible densité), des triglycérides et des AGL (Acides Gras Libres) ont été effectués en collaboration avec la plateforme Anexplo/Genotoul de Toulouse (<http://anexplo.genotoul.fr/>).

Extraction de l'ARN tissulaire et amplification par PCR

L'ARN total a été extrait d'un morceau de tissu congelé en utilisant le Kit miRNeasy Mini (Qiagen; Courtaboeuf, France). L'ADN complémentaire (ADNc) a été synthétisé à l'aide du kit High Capacity cDNA Reverse transcription Kit (Applied Biosystems) à partir d'1 µg d'ARN. La PCR en temps réel a été effectuée sur 10 ng d'ADNc à l'aide de 300 nM d'amorces sens et anti-sens et de SYBR green dans un volume final de 20 µL. L'instrument Step One Plus a été utilisé pour l'amplification et la mesure en temps réel de la fluorescence. L'amplification de l'ADNc de la Protéine Ribosomale L19 (RPL19) a été effectuée en parallèle pour normaliser la quantité d'ARN de départ (Amorce : sens GAAGGTCAAAGGGAATGTGTTCA ; anti-sens CCTTGTCTGCCTTCAGCTTGT). Les données ont été analysées en utilisant la méthode $2^{(-Ct_{RPL19} - Ct_{gène})}$ ou le Ct correspond au nombre de cycles nécessaires pour atteindre un seuil de fluorescence fixé. Les résultats ont été exprimés en unité arbitraire et normalisés avec la moyenne des valeurs obtenues dans le groupe contrôle non transplanté.

Numération de la formule sanguine

60 µL de plasma ont été prélevés à la veine caudale chez des souris nourries et vigiles. La numération sanguine a été effectuée sur 30 µL de sang à l'aide de l'analyseur de sang MICROS-60 de chez ABX-Diagnostics disponible sur la plateforme Anexplo/Genotoul de Toulouse (<http://anexplo.genotoul.fr/>). Les résultats ont été exprimés en nombre de cellules par µL de sang.

Mesure de la perméabilité intestinale paracellulaire *in vivo*

La perméabilité paracellulaire de l'intestin a été mesurée à l'aide d'une macromolécule de Dextran (4 kDa) marquée par un fluorophore (FITC pour IsoThioCyanate de Fluorescéine) et capable de passer les espaces intercellulaires de l'épithélium intestinal. Les souris ont été gavées avec une solution de dextran-FITC à une dose de 600 mg/kg. Un prélèvement de sang à la veine caudale a été réalisé 4 heures après le gavage. Après centrifugation (10 minutes, 4 °C, 2500 g), le plasma a été récupéré et le dextran-FITC a été dosé par spectrophotométrie (longueur d'onde d'excitation : 485 nm et d'émission : 530 nm). Les résultats ont été exprimés en µg de dextran/mL de plasma.

Dosage des lipopolysaccharides dans le plasma

Le dosage des lipopolysaccharides a été effectué dans du plasma de sang portal en collaboration avec l'équipe du Pr. P.D. Cani (Louvain Drug Research Institute, Metabolism and Nutrition WELBIO, Walloon Excellence in Life sciences and BIOTEchnology).

Analyses histologiques de l'iléon et quantification du nombre de cellules à mucus

A l'issu du sacrifice, environ 1 cm d'iléon distal a été prélevé et fixé à 4 °C pendant 48 heures dans du PFA 4% (ParaFormaldéhyde). Ensuite, des échantillons ont été transférés dans de l'éthanol 70% jusqu'à leur déshydratation. Les échantillons ont été déshydratés dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes puis dans du solvant (histoclear) avant d'être inclus en paraffine. La coupe est faite au microtome à 5 µm d'épaisseur. Les coupes ont ensuite été déparaffinées, hydratées et colorées à l'hématoxyline/éosine ou au bleu alcian. L'inclusion et la coloration ont été effectuées en collaboration avec le plateau d'histologie de l'institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires.

La quantification des cellules à mucus a été faite manuellement sur des coupes histologiques d'iléons colorées au bleu alcian à l'aide du module d'extension NDPI tools pour le logiciel Image J. Pour un même échantillon, 3 coupes histologiques distinctes ont été quantifiées et la moyenne des 3 coupes a été utilisée comme valeur pour chaque souris. Les résultats ont été exprimés en nombre de cellules à mucus par villosité.

Analyses taxonomiques du microbiote intestinal

Pour le **protocole #1**, l'analyse taxonomique du microbiote intestinal a été effectuée chez les souris receveuses juste avant le transfert de microbiote (microbiote basal) et 3 semaines après le transfert de microbiote (microbiote trans NC). Pour le **protocole #2**, l'analyse taxonomique du microbiote intestinal a été effectuée chez les souris receveuses juste avant de transfert (microbiote basal), 3 semaines après le transfert de microbiote (microbiote trans NC) et 6 semaines après le début du régime hyperlipidique (microbiote trans 72% HFD).

L'ADN total a été extrait des fèces congelées en utilisant le kit QIAamp DNA stool Mini kit (Qiagen, Courtabeuf, France). La région V2 de l'ADN 16S bactérien a été ciblée à l'aide de l'amorce 28F-519R et pyroséquencée par la société Research and Testing (<http://www.researchandtesting.com/>, Texas, USA) à l'aide du 454 FLX Roche technologies. 3000 séquences distinctes ont été générées en moyenne par échantillons et comparées à la banque de donnée NCBI (National Center of Biotechnology Information). Les résultats ont été exprimés en pourcentage de séquences identiques répertoriées par échantillon.

Les analyses en coordonnées principales (PCoA) ont été effectuées à l'aide du logiciel XLSTAT et les cladogrammes ont été générés avec l'application Huttenhower Galaxy (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>) à l'aide de l'algorithme LDA Effect Size (LEfSE)²⁵². LEfSE permet de représenter graphiquement les données de pyroséquencage et de mettre en lumière les différences significatives entre les taxa microbiens des différents groupes de souris analysés (pour plus de détails concernant la lecture des graphiques se reporter à la légende des figures).

La mesure de l'index de variation du microbiote intestinal a été effectuée en comparant les données de pyroséquencage obtenues avant et après le transfert de microbiote intestinal. Concrètement, pour chaque espèce bactérienne identifiée, le pourcentage d'abondance relative de l'espèce bactérienne dans l'échantillon après le transfert de microbiote a été soustrait à son pourcentage d'abondance relative obtenu avant le transfert de microbiote. L'index de variation correspond à la somme des valeurs absolues de toutes les variations de la proportion relative de chaque espèce bactérienne présente chez chaque souris avant et après le transfert de microbiote.

Analyses Fonctionnelles du microbiote intestinal

L'analyse fonctionnelle du microbiote intestinal a été effectuée par PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States)¹². Les données générées ont été représentées en analyse en composantes principales (PCA) à l'aide du logiciel STAMP (Statistical Analysis of Metagenomic Profiles)²⁵³.

Mesure de la masse grasse et de la masse maigre

Les mesures des taux de masse grasse et de masse maigre ont été effectuées par imagerie par résonance magnétique (EchoMRI-100TM 3 en 1TM). Les résultats ont été exprimés en pourcentage de masse grasse et maigre rapporté au poids de la souris.

Mesure de la taille des adipocytes

Le tissu adipeux épидидymaire a été fixé dans de l'éthanol 70% et conservé à 4°C jusqu'à la déshydratation. Ensuite, les tissus ont été déshydratés et inclus dans la paraffine à l'aide du STP 120 Spin Tissue Processor. Les blocs de paraffine ont été coupés à l'aide du microtome Microme HM340E à 5 µm d'épaisseur et colorés à l'hématoxyline/éosine. Les photos des tissus ont été obtenues avec le système Zeiss PALM MicroBeam, (objectifs Plan-Neofluar 10x (0.3 N.A.) et caméra AxioCam MRm noir et blanc). Les images ont été analysées avec le logiciel MotionTracking en utilisant la procédure développée par le Dr. G. Marsico. Le centre des adipocytes a été déterminé manuellement et la membrane a été automatiquement délimitée. Enfin, la taille des adipocytes a été représentée en distribution cumulative. La quantification des

adipocytes a été effectuée en collaboration avec l'équipe du Dr. J.F. Tanti (Inserm U1065 Cellular and Molecular Physiopathology of Obesity).

Culture et administration de la souche bactérienne *Bacteroides vulgatus*

La souche bactérienne *Bacteroides vulgatus* est issue de la Collection de l'Institut Pasteur (CIP référence 103714T). Les bactéries ont été resuspendues et cultivées dans un milieu liquide Wilkins Chalgren à 37 °C.

Des souris mâles C57Bl/6J de 6 semaines ont été gavées quotidiennement pendant 4 semaines avec 200 µL d'une suspension contenant 10⁸ CFU/mL de la bactérie *Bacteroides vulgatus* (Bv) dans du PBS anaérobie. Les groupes contrôles ont été gavés avec du PBS anaérobie et stérile. Pendant toute la durée du traitement, les souris ont été nourries avec un régime normal ou un régime hyperlipidique (72% de lipides, 28% de protéines et moins de 1% de glucides SAFA Augy, France).

Mesure de la prise alimentaire

La prise alimentaire a été mesurée en pesant la nourriture mise à disposition des souris toute les 24 heures. Un gramme de régime hyperlipidique (60% de lipides, 20% de glucides, 20% de protéines ; Research Diet #D12492) contient 5,24 kcal. Les résultats ont été exprimés en kcal consommées par jour et par souris.

Traitement au MuramylDiPeptide (MDP)

Trois groupes de 5 souris mâles, C57Bl/6J, âgées de 6 semaines et nourries sous régime normal ont été traitées pendant 4 jours consécutifs avec une injection intra-péritonéale de MuramylDiPeptide (MDP ; N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine ; Sigma Aldrich), un agoniste spécifique du récepteur NOD 2 (Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2). Le groupe contrôle (CTRL) a reçu une injection quotidienne de solvant (eau stérile), le groupe MDP 50 µg a reçu une injection quotidienne de 50 µg de MDP et le groupe MDP 100 µg a reçu une injection quotidienne de 100 µg de MDP. Le jour de la quatrième injection les souris ont été mises à jeun pendant 6 heures et un test de tolérance au pyruvate a été effectué.

Analyses statistiques

Les résultats ont été exprimés en valeurs moyennes ± l'écart standard à la moyenne (S.E.M). Les différences statistiques ont été mesurées en utilisant des tests one- ou two-way ANOVA suivis de post-tests (se reporter aux légendes des figures pour plus d'informations). Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel GraphPad Prism 6 pour Windows Vista. Une valeur p inférieure à 0,05 a été considérée comme significative.

Résultats

De nombreuses études ont démontrées qu'il était possible de transférer les maladies métaboliques d'un donneur obèse/diabétique à des souris axéniques par simple transfert de son microbiote intestinal. Lors de ma thèse, j'ai voulu déterminer l'effet métabolique du transfert du microbiote issu de souris obèses/diabétiques non pas sur des souris axéniques mais sur des souris conventionnelles jamais traitées avec des antibiotiques.

I- Effet du transfert du microbiote issu de souris obèses et minces sur le métabolisme des souris receveuses

Afin d'évaluer l'impact du transfert d'un microbiote issu d'une souris obèse sur l'homéostasie glucidique d'une souris conventionnelle, nous avons transféré le contenu caecal de souris nourries avec un régime hyperlipidique pendant 3 mois (microbiote OM(HFD) avec OM pour Obese Microbiota et HFD pour High Fat Diet) dans des souris saines, conventionnelles jamais traitées au préalable avec des antibiotiques. Nous avons également transféré le microbiote de souris minces nourries avec un régime normal (microbiote LM avec LM pour Lean Microbiota) et nous avons gavé des souris avec du PBS réduit et stérile (le véhicule dans lequel nous avons resuspendu les bactéries du transplant). Pour ce premier protocole nous avons donc 3 groupes d'études : des souris ayant reçu le « microbiote obèse OM(HFD) » (groupe Conv + OM(HFD)), des souris ayant reçu le « microbiote mince LM » (groupe Conv + LM) et des souris contrôles non transplantées (groupe Conv + PBS). Le protocole de transfert caecal est détaillé en **Figure 23**.

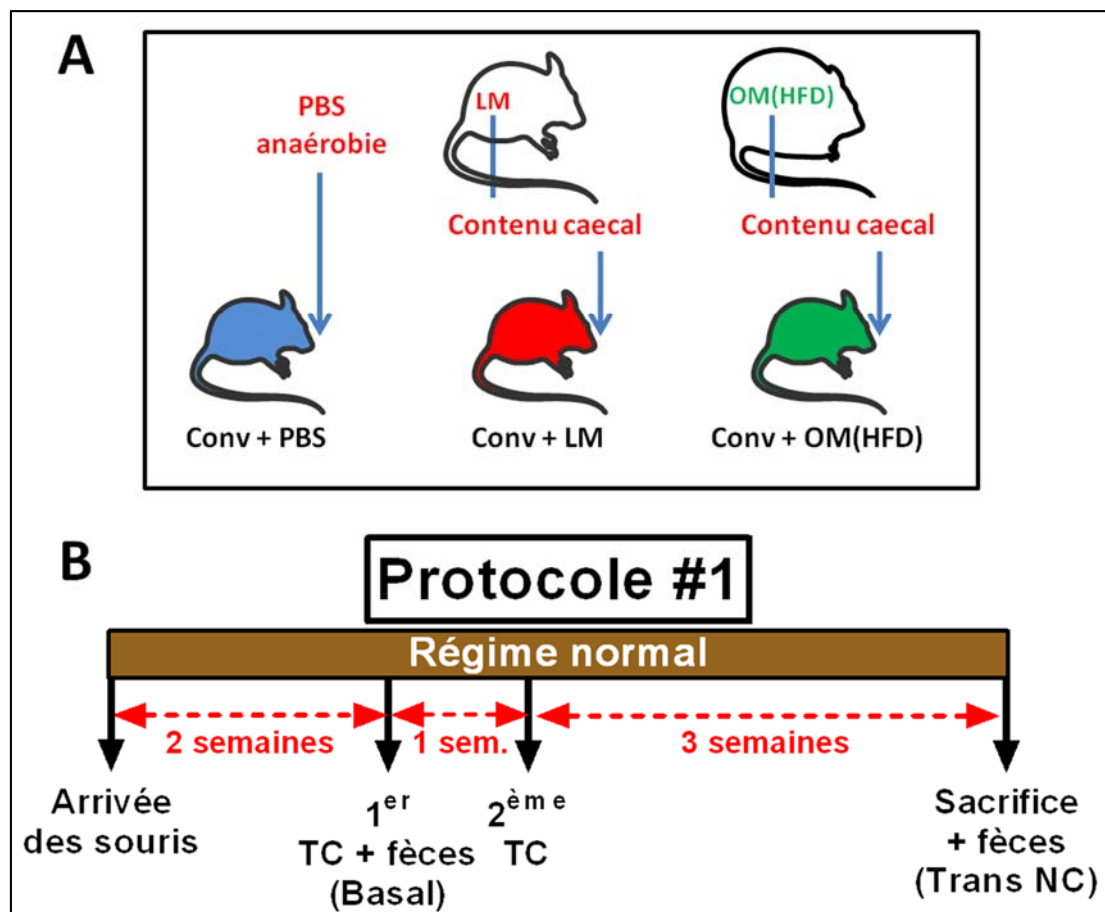


Figure 23: Schéma du protocole expérimental #1.

(A) Des souris mâles C57Bl/6J âgées de 6 semaines ont reçu par gavage le microbiote caecal de souris minces nourries avec un régime normal (groupe Conv + LM avec Conv pour conventionnelle et LM pour Lean Microbiota) ou le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques nourries avec un régime hyperlipidique pendant 3 mois (groupe Conv + OM(HFD) avec Conv pour conventionnelle, OM pour Obese Microbiota et HFD pour High Fat Diet). Le groupe de souris contrôles a reçu du PBS anaérobie par gavage (groupe Conv + PBS). (B) Le microbiote des souris donneuses a été administré à 2 reprises espacées d'une semaine (1^{er} TC signifie 1^{er} Transfert Caecale et 2^{ème} TC signifie 2^{ème} Transfert Caecal). Afin d'inoculer aux souris receveuses un microbiote non congelé nous avons sacrifié des nouvelles souris donneuses lors de chaque gavage. Trois semaines après le deuxième gavage, des analyses métaboliques ont été effectuées chez les souris receveuses qui ont ensuite été sacrifiées. Pendant toute la procédure, les souris receveuses ont été nourries avec un régime normal et jamais traitées avec des antibiotiques. Le microbiote contenu dans les fèces a été analysé par pyroséquençage à 2 reprises: juste avant le transfert caecal (Basal) et 3 semaines après le transfert caecal (Trans NC avec NC pour Normal Chow).

A. Analyses des suspensions bactériennes de gavage

Dans un premier temps nous avons mis en culture les suspensions de gavage contenant le microbiote obèse et le microbiote mince afin de vérifier la viabilité des bactéries à l'issue du protocole de préparation. Nous avons constaté que la quantité de bactéries aérobies et cultivables était sensiblement la même entre les 2 suspensions (**Fig. 24, A**). Néanmoins, la suspension contenant le microbiote de souris minces semble être plus concentrée en bactéries cultivables et anaérobies. Celle-ci est constituée d'environ 10^8 bactéries dans 100 μ L de suspension contre 10^6 bactéries pour la suspension de microbiote OM(HFD) (**Fig. 24, B**). Cependant la majorité des bactéries intestinales n'étant pas cultivable, la charge bactérienne ne peut pas être déterminée avec précision avec la méthode de culture et nous apprécions ici seulement la viabilité de certaines bactéries du transplant. Afin de quantifier la charge bactérienne, nous avons dosé l'ADN contenu dans 200 μ L de suspension de transplant (**Fig. 24, C**). Lors des 2 gavages espacés d'une semaine, nous avons mesuré environ 2 fois plus d'ADN dans la suspension de « microbiote LM » que dans la suspension de « microbiote OM(HFD) ». Ces résultats laissent penser que malgré une concentration en grammes de contenu caecal par millilitre similaire entre les 2 suspensions de transplant, la charge bactérienne apparaît plus importante dans la suspension de microbiote LM. Enfin, nous avons analysé par pyroséquençage les différentes espèces bactériennes présentes dans les 2 suspensions. Comme attendu, le microbiote de souris minces est différent de celui de souris obèses/diabétiques (**Fig. 24 D,E**). De plus, pour chaque type de microbiote, la composition bactérienne des 2 suspensions de gavage utilisées à une semaine d'intervalle sont très proche (**Fig. 24, E**).

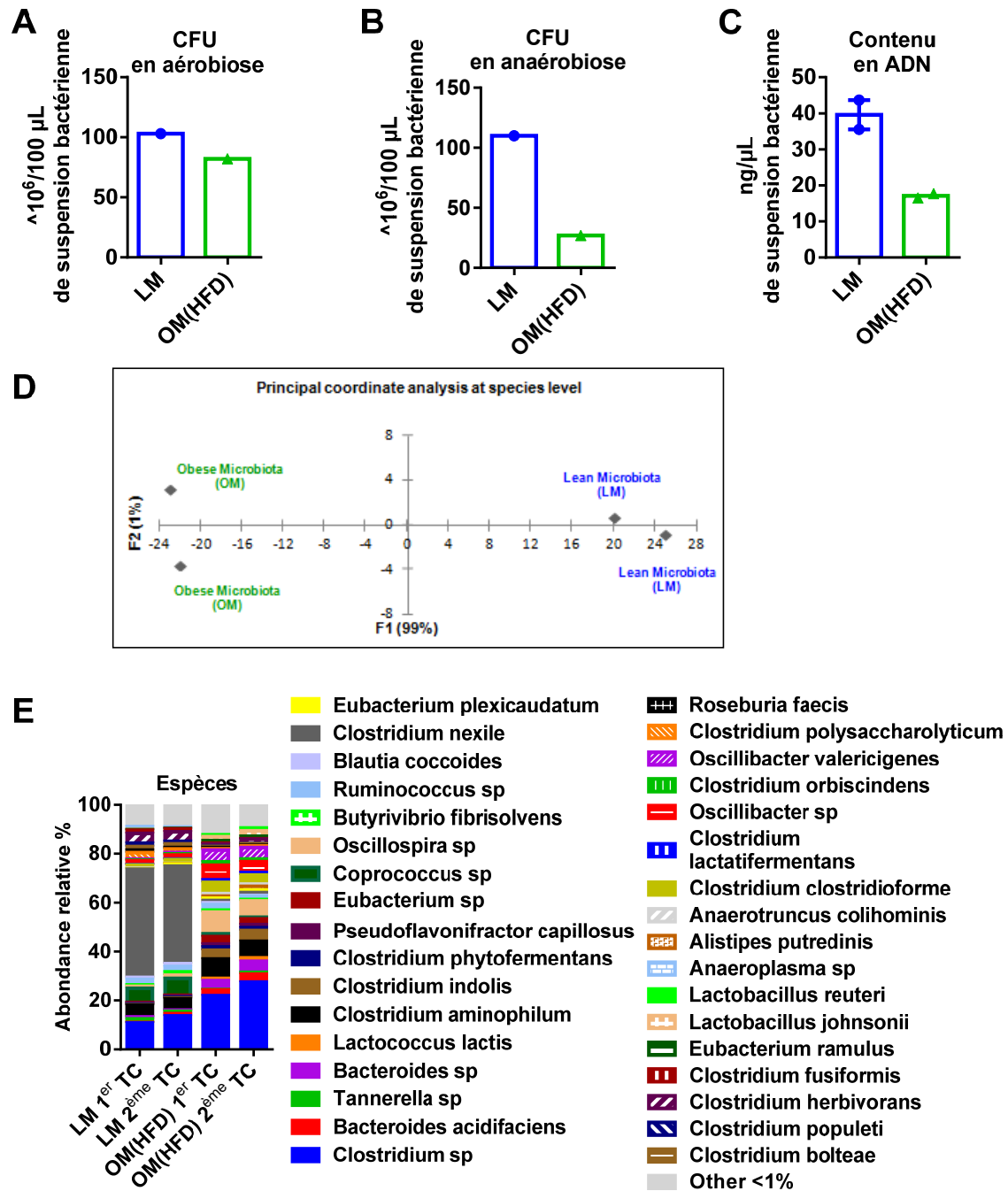


Figure 24: Analyses du transplant du premier protocole #1.

Le contenu caecal de 3 à 6 souris donneuses a été extrait et homogénéisé sous hotte dans du PBS anaérobie et stérile pour une concentration finale de 200 mg/mL. 200 µL de cette suspension caecale ont été administrés par gavage aux souris receveuses, en condition nourrie. L'ensemble de cette procédure a été répétée une semaine après le premier gavage. A l'issue de chaque gavage, la suspension caecale ainsi préparée a été analysée. Quantification des colonies bactériennes présentes dans la suspension du premier gavage après mise en culture sur boîte (A) en condition aérobie et (B) anaérobie. (C) Quantification de la quantité d'ADN présente dans 200 µL de la suspension utilisée pour le premier et le deuxième gavage. (D) Analyse en coordonnées principales (PCoA) du microbiote présent dans les suspensions de gavage. (E) Proportions relatives des différentes espèces bactériennes présentes dans les suspensions de gavage.

B. Le transfert caecal est-il bien toléré par les souris receveuses ?

Chez l'Homme, le transfert du microbiote d'un individu à l'autre est bien toléré par la personne receveuse et il n'est pas constaté de réaction inflammatoire majeure à l'issue de la procédure. Néanmoins, avant d'étudier plus en détail le métabolisme de nos souris receveuses, nous nous sommes assurés que le transfert du microbiote caecal était bien supporté. Nous n'avons pas constaté de variation de poids corporel en comparant les 2 groupes de souris transplantées et le groupe Conv + PBS (**Fig. 25 A**). Cependant, 48 heures après le premier transfert caecal (1^{er} TC) nous avons mesuré une quantité de leucocytes supérieure dans le sang des souris transplantées quelle que soit l'origine du microbiote (LM ou OM(HFD)) (**Fig. 25, B**). Cette numération leucocytaire sanguine plus élevée est expliquée par l'augmentation significative des lymphocytes, des monocytes et des granulocytes dans les 2 groupes de souris transplantées comparativement aux souris contrôles (**Fig. 25, C-E**). Cette méthode de numération sanguine est effectuée en routine en clinique et une augmentation des leucocytes circulants est le reflet de l'activation du système immunitaire. Par conséquent, ces résultats laissent penser que le gavage des suspensions bactériennes a induit une activation rapide du système immunitaire. Néanmoins, cette activation immunitaire apparaît comme transitoire puisque les numérations leucocytaires ne sont plus différentes 3 semaines après le deuxième gavage de microbiote entre les groupes transplantés et le groupe contrôle (**Fig. 25, F-I**). Ces résultats suggèrent que le transfert de microbiote intestinal est perçu par le système immunitaire dans les jours qui suivent le gavage. L'activation du système immunitaire est transitoire et le transfert de microbiote est bien toléré par les souris receveuses.

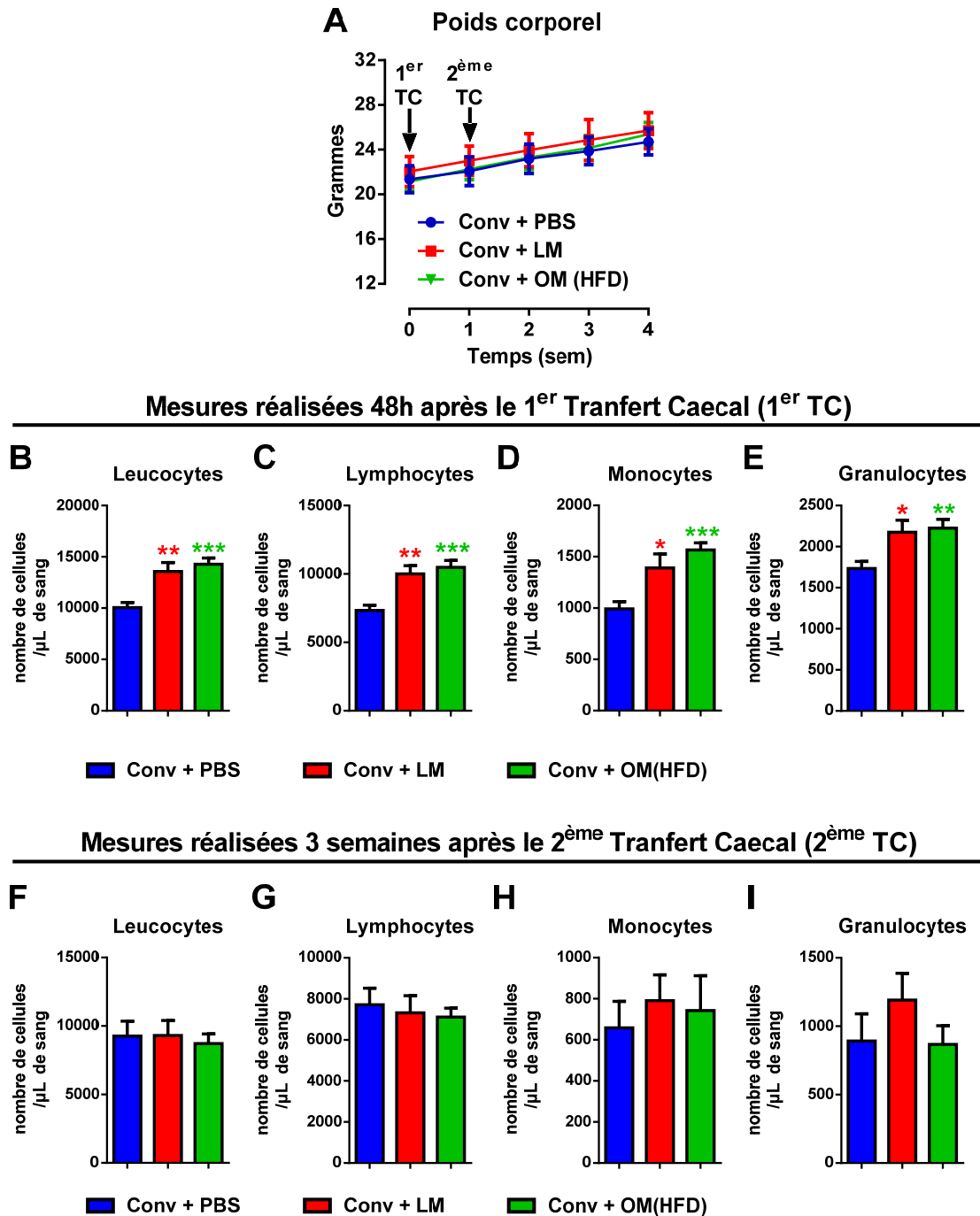


Figure 25: Numération des leucocytes dans le sang des souris receveuses.

Deux groupes de 6 souris mâles ont reçu par gavage le microbiote caecal de souris minces nourries avec un régime normal (groupe Conv + LM en rouge) ou le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques nourries avec un régime hyperlipidique (groupe Conv + OM(HFD) en vert). Le groupe de 6 souris contrôles a reçu du PBS anaérobie par gavage (groupe Conv + PBS en bleu). Le microbiote des souris donneuses a été administré à 2 reprises espacées d'une semaine (1^{er} TC signifie premier Transfert Caecal et 2^{ème} TC signifie deuxième Transfert Caecal). (A) Mesure du poids corporel au cours du temps. Numération des différentes populations de cellules immunitaires dans le sang (B) Leucocytes, (C) Lymphocytes, (D) Monocytes, et (E) Granulocytes 48 heures après le 1^{er} gavage de microbiote caecal. Numération des différentes populations de cellules immunitaires dans le sang (F) Leucocytes, (G) Lymphocytes, (H) Monocytes, et (I) Granulocytes 3 semaines après le 2^{ème} gavage de microbiote caecal. Les résultats ont été exprimés en valeurs moyennes \pm l'écart standard à la moyenne (S.E.M). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, one-way ANOVA et post-test de Dunnett, les groupes traités ont été comparés au groupes contrôles Conv + PBS.

C. Analyses du métabolisme glucidique des souris receveuses

La mesure de la glycémie à jeun est la méthode de référence communément utilisée pour diagnostiquer le diabète de type 2 et pour investiguer l'homéostasie glucidique. Trois semaines après le deuxième gavage, nous avons mesuré une glycémie à jeun significativement plus faible chez le groupe de souris Conv + OM(HFD) comparativement au groupe de souris Conv + PBS (**Fig. 26, A**). A l'inverse, la glycémie des souris Conv + LM n'a pas été modifiée comparativement aux souris contrôles Conv + PBS (**Fig. 26, A**). Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la glycémie est le reflet de l'équilibre entre l'entrée et la sortie du glucose du sang. Afin de mesurer, la capacité des souris transplantées à utiliser le glucose sanguin, nous avons effectué un test de tolérance oral au glucose (**Fig. 26, B**). L'hyperglycémie induite par le gavage de glucose a été gérée de manière équivalente chez toutes les souris et aucune intolérance au glucose n'a été observée. Nous avons alors voulu déterminer le flux entrant du glucose dans le sang. Lors du jeûne, l'absorption intestinale de glucose est nulle et l'entrée du glucose dans le sang est principalement assurée par le foie. Nous avons donc mesuré les stocks de glycogène hépatique chez les souris transplantées et nous n'avons pas mis en évidence des différences significatives (**Fig. 26, C**). Cependant, nous avons observé une conversion du pyruvate en glucose significativement plus faible entre les souris Conv + OM(HFD) et les souris Conv + PBS traduisant une baisse probable de la néoglucogenèse hépatique (**Fig. 26, D**). Le glucagon étant l'hormone majoritairement impliquée dans l'induction de la néoglucogenèse hépatique, nous avons mesuré l'état d'activation de la PKA dans le foie, une kinase activée dans la voie de signalisation en aval du récepteur au glucagon. L'état de phosphorylation des substrats de la PKA n'a pas été modifié entre les 3 groupes de souris suggérant une absence de modifications dans la voie de signalisation du glucagon (**Fig. 26, E**). Par ailleurs, aucune modification d'expression des enzymes clefs de la néoglucogenèse hépatique PEPCK et G6Pase n'a été observée que ce soit par microarray (résultats non présentés), par PCR (résultats non présentés) ou par western blot (**Fig. 26, F**). Néanmoins, nous avons mesuré une diminution significative de l'activité de la PEPCK dans le foie des souris Conv + OM(HFD) comparativement au groupe de souris non transplantées (**Fig. 26, G**). L'activité de la G6Pase n'a pas été modifiée chez les 2 groupes de souris transplantées (**Fig. 26, H**). D'autre part, l'analyse métabolomique du plasma a permis de mettre en évidence une augmentation de la concentration de lactate et de pyruvate dans le sang des souris Conv + OM(HFD) (**Fig. 27 A-C**). L'augmentation des précurseurs néoglucogéniques dans le sang des souris Conv + OM(HFD) peut traduire une diminution de leur conversion en glucose par le foie.

L'ensemble des résultats détaillés en **figure 26** et **27** suggère que le transfert d'un microbiote OM(HFD) chez des souris conventionnelles induit une baisse de la glycémie à jeun probablement due à une baisse de la néoglucogenèse hépatique chez les souris transplantées. Ces résultats n'ont pas été retrouvés chez les souris ayant reçu un microbiote issu de souris minces (groupe Conv + LM).

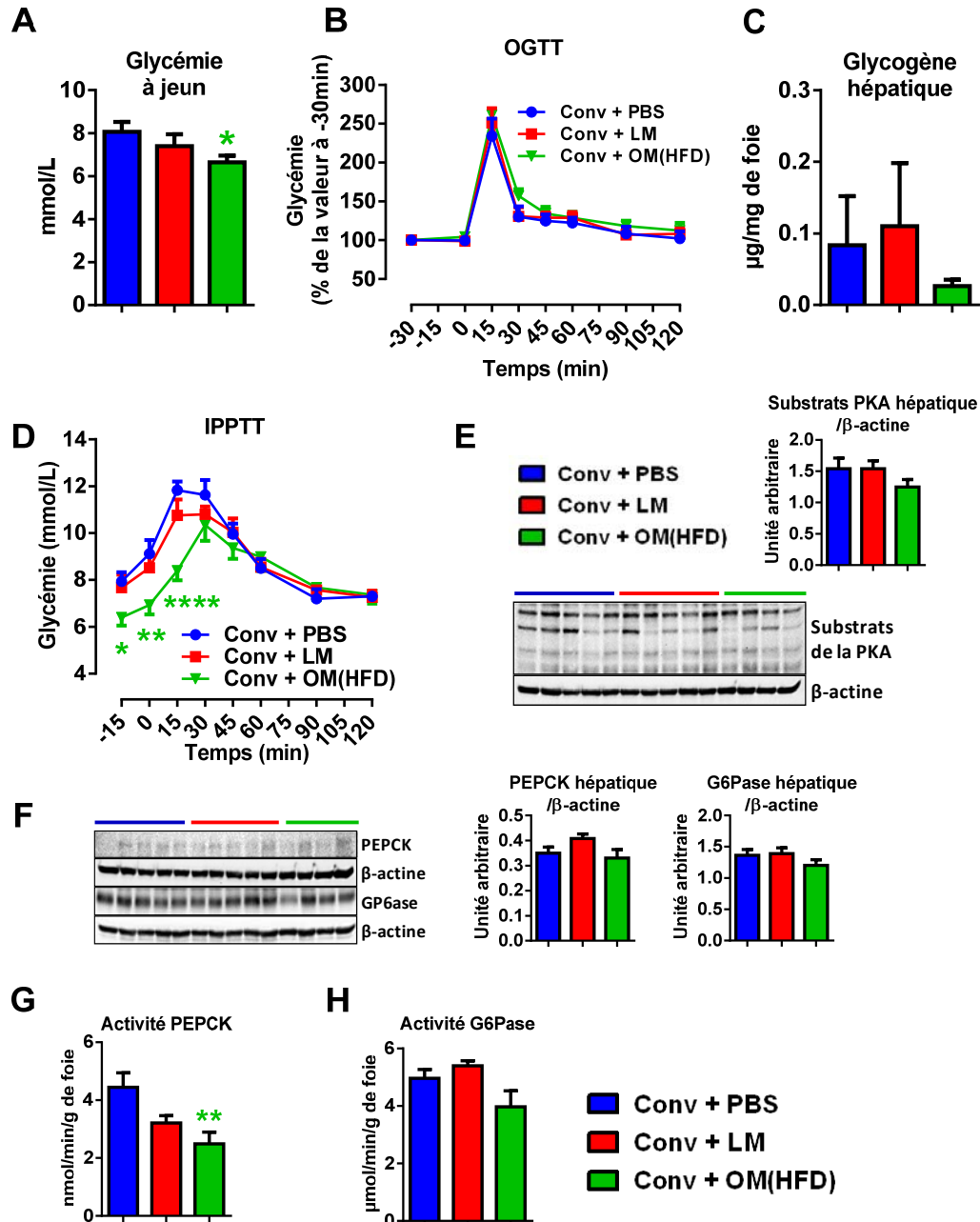


Figure 26: Impact du transfert de microbiote sur le métabolisme hépatique des souris receveuses.

Deux groupes de 6 souris mâles ont reçu par gavage le microbiote caecal de souris minces nourries avec un régime normal (groupe Conv + LM en rouge) ou le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques nourries avec un régime hyperlipidique (groupe Conv + OM(HFD) en vert). Le groupe de 6 souris contrôles a reçu du PBS anaérobie par gavage (groupe Conv + PBS en bleu). L'ensemble des analyses présentées sur la figure a été effectué après 6 heures de jeûne. (A) Glycémie. (B) Test de Tolérance Oral au Glucose (OGTT). (C) Contenu hépatique en glycogène. (D) Test de Tolérance Intra-Péritonéal au Pyruvate (IPPTT). (E) Analyse western blot de la phosphorylation des substrats de la PKA sur un extrait protéique de foie. L'intensité des bandes a été quantifiée et normalisée sur la β-actine (témoin de chargement du gel). (F) Quantification par western blot de la quantité de PEPCK et de G6Pase normalisée sur la quantité de β-actine. Activités enzymatiques de (G) la PEPCK et de (H) la G6Pase. Les résultats ont été exprimés en valeurs moyennes ± l'écart standard à la moyenne (S.E.M). *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001, (A) Test t de student, (D) two-way ANOVA et post-test de Sidak, les groupes traités ont été comparés au groupe contrôle Conv + PBS, (G) one-way ANOVA et post-test de Dunnett, les groupes traités ont été comparés au groupe contrôle Conv + PBS.

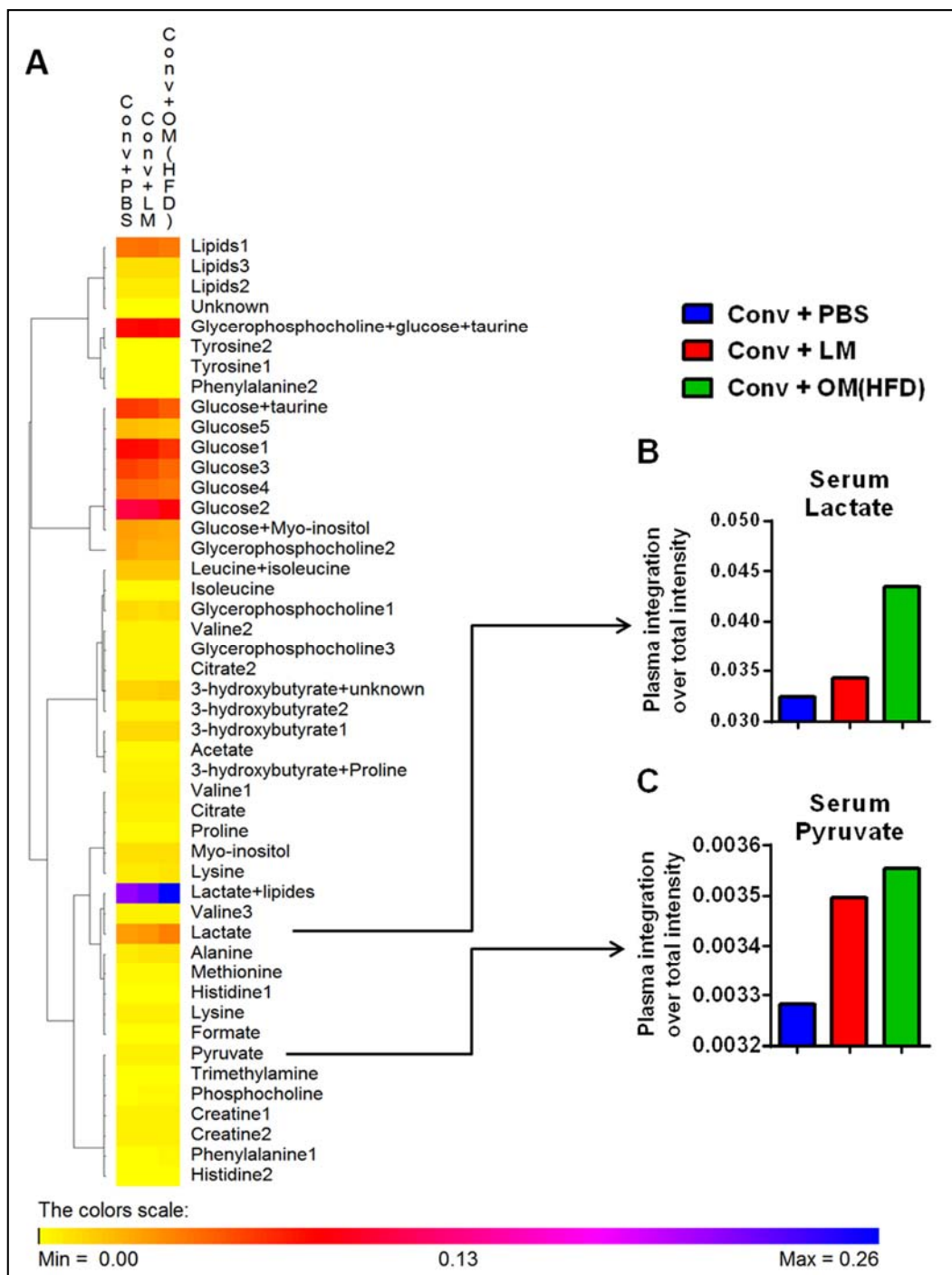


Figure 27: Analyses métabolomiques du plasma des souris receveuses.

Deux groupes de 6 souris mâles ont reçu par gavage le microbiote caecal de souris minces nourries avec un régime normal (groupe Conv + LM en rouge) ou le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques nourries avec un régime hyperlipidique (groupe Conv + OM(HFD) en vert). Le groupe de 6 souris contrôles a reçu du PBS anaérobie par gavage (groupe Conv + PBS en bleu). Trois semaines après le transfert caecal 50 μ L de plasma de chaque souris ont été regroupés et le métabolome a été analysé sur le mélange de plasma. **(A)** Analyse du métabolome plasmatique 3 semaines après le transfert de microbiote **(B)** lactate plasmatique et **(C)** pyruvate plasmatique.

Dans l'optique de mieux comprendre les modifications du métabolisme hépatique des souris receveuses nous avons effectué une analyse d'expression génique par microarray sur le

foie. Cette analyse a permis de mettre en évidence l'ensemble des gènes différentiellement exprimés entre les groupes de souris Conv + OM(HFD) et Conv + PBS et entre les groupes Conv + LM et Conv + PBS. Quels que soit les groupes, parmi la totalité des gènes significativement modulés, aucun n'a été identifié comme étant directement impliqué dans la néoglucogénèse hépatique. Ces résultats suggèrent que la diminution des marqueurs de la néoglucogénèse hépatique observés en **Figure 25** n'est pas due à des modifications d'expression génique des gènes impliqués dans cette voie. Au vue de ces résultats, nous avons procédé à une analyse sans apriori des données du microarray. Nous avons utilisé le logiciel STRING afin de déterminer toutes les associations fonctionnelles existantes entre l'ensemble des gènes significativement modulés entre les groupes de souris Conv + OM(HFD) et Conv + PBS et entre les groupes Conv + LM et Conv + PBS. Cette analyse, nous a permis de mettre en évidence une diminution significative de l'expression des enzymes impliquées dans la lipogenèse *de novo* entre le groupes de souris Conv + OM(HFD) et Conv + PBS (**Fig. 28, A, B**). Au contraire, l'analyse STRING des gènes significativement modulés entre les groupes Conv + LM et Conv + PBS n'a pas révélé de voies métaboliques modulées (résultats non présentés).

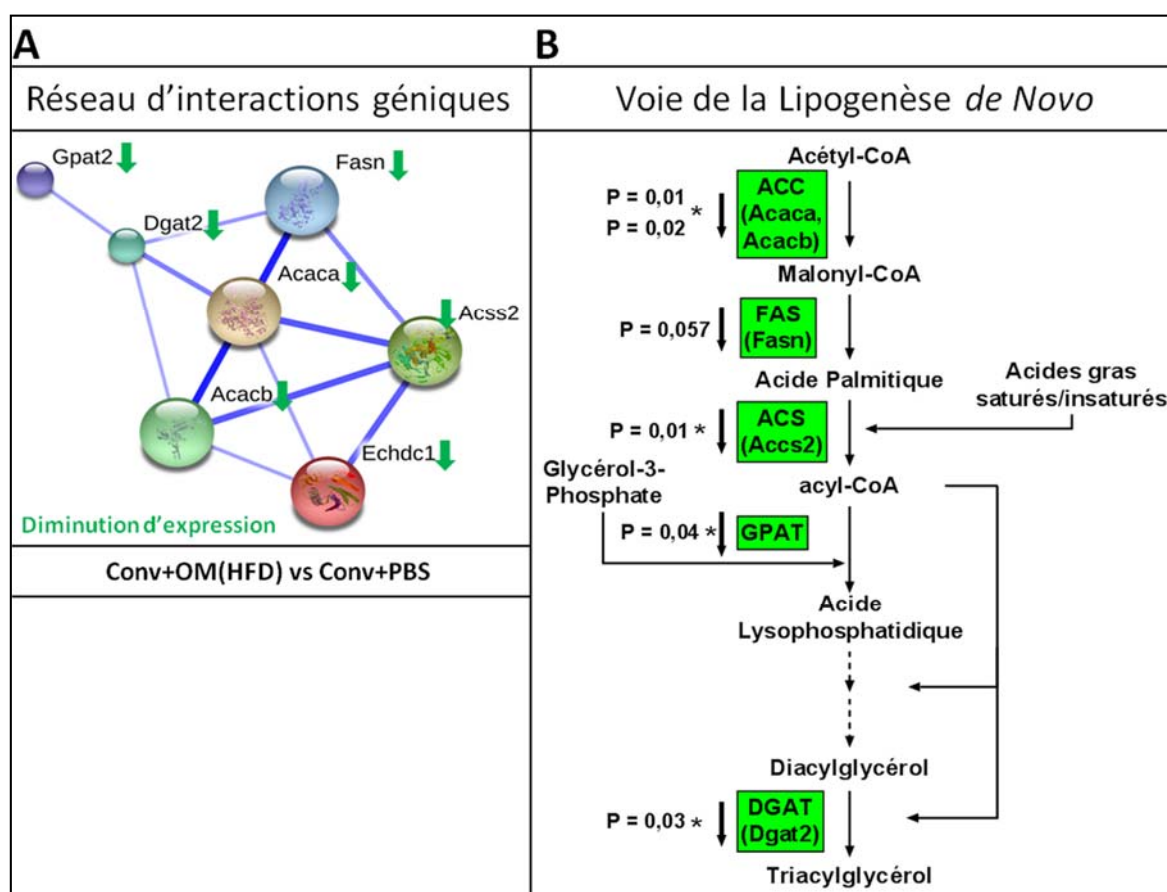


Figure 28: Analyses du transcriptome hépatique des souris receveuses.

Un groupe de 6 souris mâles a reçu le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques nourries avec un régime hyperlipidique (groupe Conv + OM(HFD)). Le groupe de 6 souris contrôles a reçu du PBS anaérobie par gavage (groupe Conv + PBS). Les souris ont été sacrifiées 3 semaines après le transfert de microbiote après 6 heures de jeûne et l'expression des gènes hépatiques a été analysée par microarray. L'ensemble des gènes significativement modulés entre le groupe Conv + OM(HFD) et Conv + PBS ont été analysés par le logiciel STRING. (A) Réseau de gènes interconnectés et impliqués dans le métabolisme hépatique identifiés par STRING. (B) Schéma de la lipogenèse *de novo* chez les souris Conv+ OM(HFD). Les analyses statistiques ont été effectuées en comparant l'expression relative des gènes du groupe Conv + OM(HFD) et Conv + PBS à l'aide d'un Test t de student.

D. Analyses générales du profil hépatique des souris receveuses

Le transfert du microbiote issu de souris obèses/diabétiques dans des souris axéniques est capable d'induire une augmentation des triglycérides hépatiques chez les souris transplantées¹⁰⁷. Dans notre modèle de transfert de microbiote chez la souris conventionnelle, nous n'avons pas mis en évidence d'hypertrophie hépatique (**Fig. 29, A**) ou d'accumulation anormale de triglycérides dans le foie (**Fig. 29, B**). De plus, les taux plasmatiques des transaminases (marqueurs associés à une souffrance hépatique) ne se sont pas révélés significativement différents entre les 3 groupes de souris (**Fig. 29, C, D**). Par ailleurs, l'expression des cytokines pro-inflammatoires connues pour être augmentées dans le foie de souris obèses/ diabétiques n'a pas été modifiée lors du transfert du microbiote OM(HFD) dans des souris conventionnelles (**Fig. 29, E**).

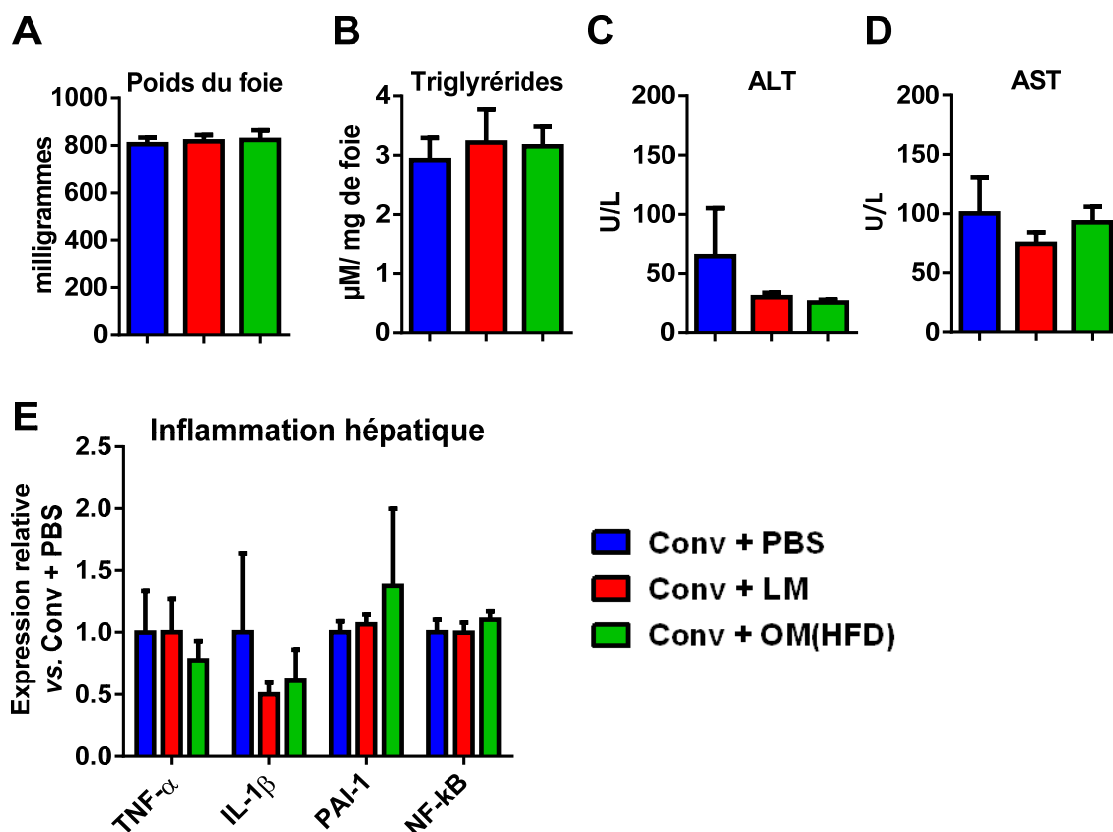


Figure 29: Analyses complémentaires effectuées sur le foie des souris receveuses.

Deux groupes de 6 souris mâles ont reçu par gavage le microbiote caecal de souris minces nourries avec un régime normal (groupe Conv + LM en rouge) ou le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques nourries avec un régime hyperlipidique (groupe Conv + OM(HFD) en vert). Le groupe de 6 souris contrôles a reçu du PBS anaérobie par gavage (groupe Conv + PBS en bleu). Trois semaines après le transfert de microbiote les souris ont été sacrifiées après 6 heures de jeûne et le foie a été prélevé. (A) Poids du foie. (B) Contenu hépatique en triglycérides. Dosage plasmatique des transaminases (C) ALanine aminoTransférase (ALT) et (D) ASpartate aminoTransférase (AST). (E) Expression des

cytokines pro-inflammatoires (TNF- α pour Tumor Necrosis Factor- α , IL-1 β pour InterLeukine-1 β , PAI-1 pour Plasminogen Activator Inhibitor-1 et NF- κ B pour Nuclear Factor- κ B). Les résultats ont été exprimés en valeurs moyennes \pm l'écart standard à la moyenne (S.E.M).

II- Evaluation de l'intégrité de la barrière intestinale chez les souris receveuses

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, des altérations de la barrière intestinale peuvent être à l'origine des désordres métaboliques. Lorsque la perméabilité augmente, des composés d'origine intestinale peuvent alors massivement pénétrer dans l'organisme et être à l'origine des modifications du métabolisme hépatique (**cf Introduction III-B-3**). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons évalué la perméabilité intestinale paracellulaire des 3 groupes de souris. Nous n'avons pas constaté de modifications significatives de la perméabilité paracellulaire de l'ensemble de l'intestin (**Fig. 30, A**), ni de modifications significatives des taux de LPS mesurés dans le sang portal (**Fig. 30, B**). Dans notre laboratoire, plusieurs études ont mesuré une augmentation de la perméabilité intestinale spécifiquement au niveau de l'iléon au cours des maladies métaboliques. C'est pourquoi nous nous sommes focalisés sur cette région intestinale. Nous n'avons pas constaté de modification du nombre de cellules à mucus (**Fig. 30, C**), ni de modification de l'expression de Muc-2 le gène codant pour la mucine (protéine du mucus) majoritairement présente dans l'intestin (**Fig. 30, D**). De plus, nous n'avons pas observé de diminution significative d'expression des gènes codants pour les protéines impliquées dans la cohésion des jonctions serrées (**Fig. 30, E**). Par ailleurs, l'expression des gènes codants pour les défensines (peptides antimicrobiens impliqués dans l'immunité innée) n'a pas été modulée par le transfert caecal (**Fig. 30, F**). De plus, les marqueurs impliqués dans les réponses immunitaires ont révélé une forte augmentation de l'expression de l'IL-17a dans l'iléon des souris ayant reçu le microbiote LM comparativement au groupe de souris contrôles (**Fig. 30, G**). Cependant, l'expression de Foxp3, IFN- γ et NF- κ B n'a pas été modifiée par le transfert de microbiote quel que soit le groupe de souris. Aucune modification structurelle n'a été détectée après l'analyse histologique de plusieurs coupes iléales colorées à l'hématoxyline/éosine (**Fig. 31**). Enfin, la coloration du mucus au bleu alcian n'a pas permis de détecter des modifications histologiques entre les 3 groupes de souris (**Fig. 32**).

L'ensemble de ces résultats met en lumière que le transfert du microbiote de souris minces ou de souris obèses n'a pas modifié la barrière intestinale des souris transplantées.

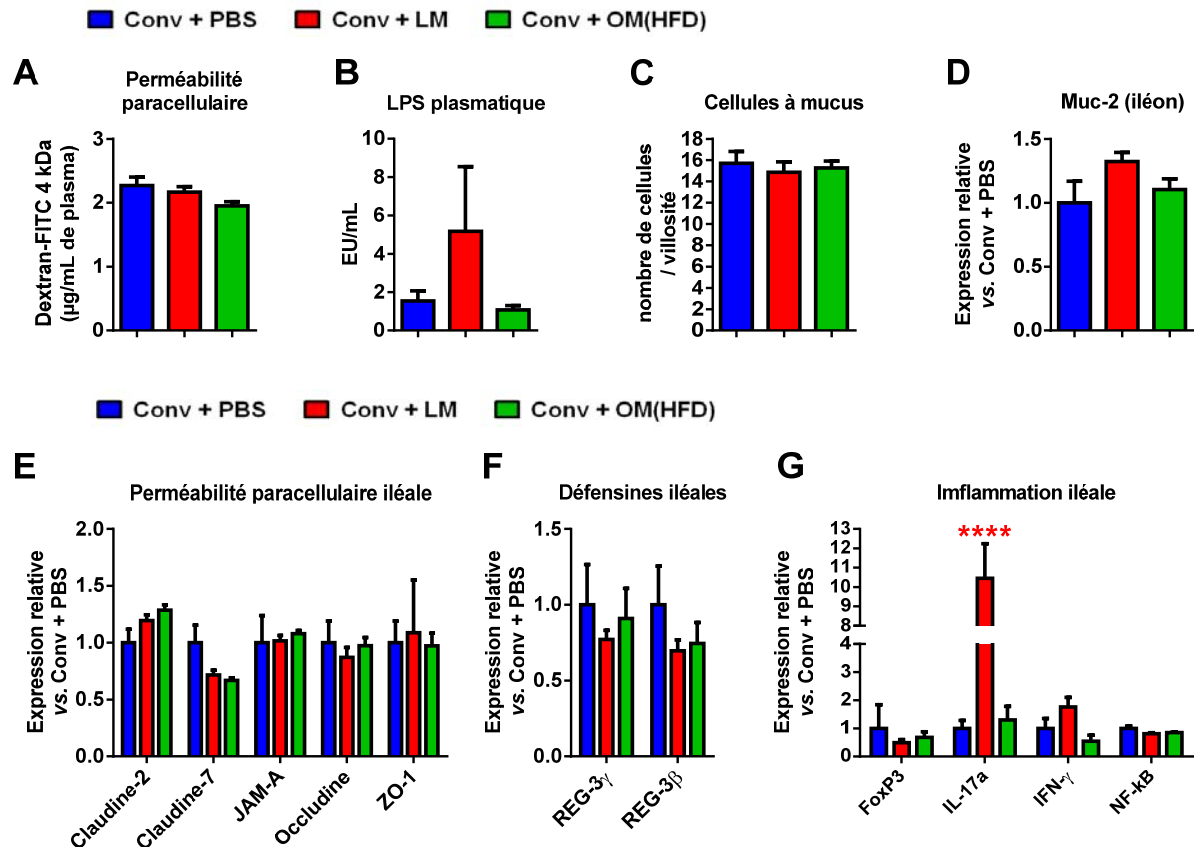


Figure 30: Analyses de la barrière intestinale des souris receveuses.

Deux groupes de 6 souris mâles ont reçu par gavage le microbiote caecal de souris minces nourries avec un régime normal (groupe Conv + LM en rouge) ou le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques nourries avec un régime hyperlipidique (groupe Conv + OM(HFD) en vert). Le groupe de 6 souris contrôles a reçu du PBS anaérobie par gavage (groupe Conv + PBS en bleu). Les souris ont été sacrifiées trois semaines après le transfert de microbiote après 6 heures de jeûne (A) Mesure de la perméabilité intestinale *in vivo*. (B) Dosage des LPS (LipoPolySaccharides) dans le plasma portal. (C) Quantification histologique du nombre de cellules à mucus par villosité intestinale iléale. Expression iléale (D) de Muc-2, (E) des gènes des jonctions serrées (JAM-A pour Junctional Adhesion Molecule-A et ZO-1 pour Zonula Occludens-1) (F) des défensines (REG-3 γ et REG-3 β pour REGenerating islet-derived protein-3 γ et β) (G) et des marqueurs de l'inflammation (Foxp3 pour Forkhead box P3, IL-17a pour InterLeukine-17a, IFN- γ pour InterFéron- γ et NF- κ B pour Nuclear Factor- κ B). Les résultats ont été exprimés en valeurs moyennes \pm l'écart standard à la moyenne (S.E.M). ****p<0.0001, (G) two-way ANOVA et post-test de Dunnett les groupes traités ont été comparés au groupes contrôles Conv + PBS.

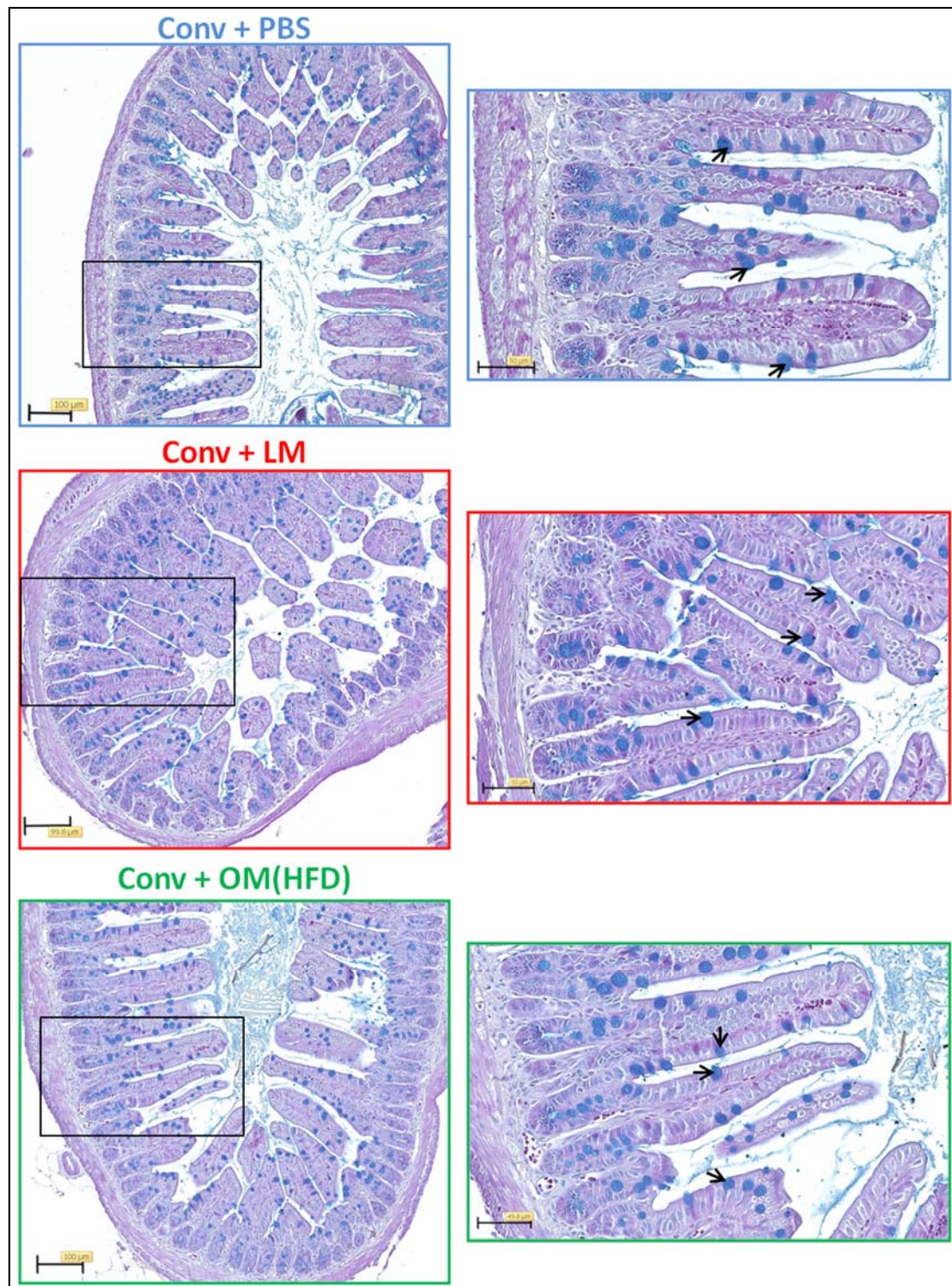


Figure 31: Analyses histologiques de l'iléon des souris receveuses en coloration bleu alcian.

Deux groupes de 6 souris mâles ont reçu par gavage le microbiote caecal de souris minces nourries avec un régime normal (groupe Conv + LM en rouge) ou le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques nourries avec un régime hyperlipidique (groupe Conv + OM(HFD) en vert). Le groupe de 6 souris contrôles a reçu du PBS anaérobie par gavage (groupe Conv + PBS en bleu). Coupes histologiques représentatives de l'iléon des 3 groupes de souris receveuses colorées au bleu alcian. Les flèches sur les panels de droite indiquent des cellules à mucus (l'ensemble des cellules à mucus n'est pas identifié par des flèches). Sur les 3 panels de gauche, l'échelle de la figure mesure 100 µm et sur les 3 panels de droite l'échelle mesure 50 µm.



Figure 32: Analyses histologiques de l'iléon des souris receveuses en coloration Hématoxyline/Eosine (HE).

Deux groupes de 6 souris mâles ont reçu par gavage le microbiote caecal de souris minces nourries avec un régime normal (groupe Conv + LM en rouge) ou le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques nourries avec un régime hyperlipidique (groupe Conv + OM(HFD) en vert). Le groupe de 6 souris contrôles a reçu du PBS anaérobie par gavage (groupe Conv + PBS en bleu). Coupes histologiques représentatives de l'iléon des 3 groupes de souris receveuses colorées à l'hématoxyline/éosine.

III- Analyses taxonomiques et fonctionnelles du microbiote intestinal des souris receveuses

Lors de ma thèse nous avons voulu déterminer si les modifications du métabolisme hépatique des souris transplantées étaient associées à des modifications du microbiote intestinal. Pour cela, nous avons procédé à 2 types de comparaison. Pour chaque groupe, nous avons comparé les bactéries intestinales présentes dans les fèces des souris receveuses avant et après le transfert de microbiote. Cette analyse nous a permis d'évaluer l'impact du transplant sur le microbiote des souris receveuses. Ensuite, nous avons également comparé le microbiote présent dans les 3 groupes de souris avant et après le transfert caecal afin d'apprécier les différences entre les groupes de souris au même instant.

A. Comparaison du microbiote fécal avant et après le transfert pour chaque groupe de souris receveuses

Afin de mieux comprendre l'impact du transfert du microbiote intestinal de souris minces (LM) et de souris obèses/diabétiques nourries pendant 3 mois avec un régime hyperlipidique (OM(HFD)) sur la composition du microbiote intestinal des souris receveuses, nous avons comparé le microbiote présent dans les fèces avant et après le transfert caecal. Nous avons d'abord procédé à une analyse en coordonnées principales (PCoA) afin de répartir dans un espace à 2 dimensions chaque souris uniquement en fonction de leur microbiote. Chaque

souris est représentée par un point sur la figure et plus le microbiote d'une souris est différent de celui d'une autre souris plus ces souris sont éloignées sur le graphique.

L'analyse en coordonnées principales du microbiote intestinal des souris non transplantées Conv + PBS a mis en évidence une séparation des souris entre les conditions basale et Trans NC. Ces résultats laissent penser que malgré l'absence de transfert de microbiote dans ce groupe, le microbiote présent avant et après le gavage au PBS réduit comporte des différences (**Fig. 33, A**). Ces résultats sont retrouvés chez les groupes de souris Conv + LM et Conv + OM(HFD) (**Fig. 33, B, C**). Afin de quantifier les variations de microbiote pour chaque souris nous avons calculé pour chaque espèce bactérienne la variation d'abondance entre avant (condition basale) et après le transfert caecal (condition Trans NC) et nous avons fait la somme de toutes ces variations. Ce calcul nous a permis de mettre en évidence que le microbiote des souris transplantées avec le microbiote LM ou OM(HFD) variait significativement plus que le microbiote des souris non transplantées (**Fig. 33, D**). De manière générale, nous pouvons conclure que le microbiote des souris Conv + PBS semble varier au cours du temps malgré l'absence de transfert de microbiote. Néanmoins, la variation dans la composition du microbiote des souris receveuses apparaît comme significativement plus importante lorsque les souris reçoivent le microbiote des souris donneuses.

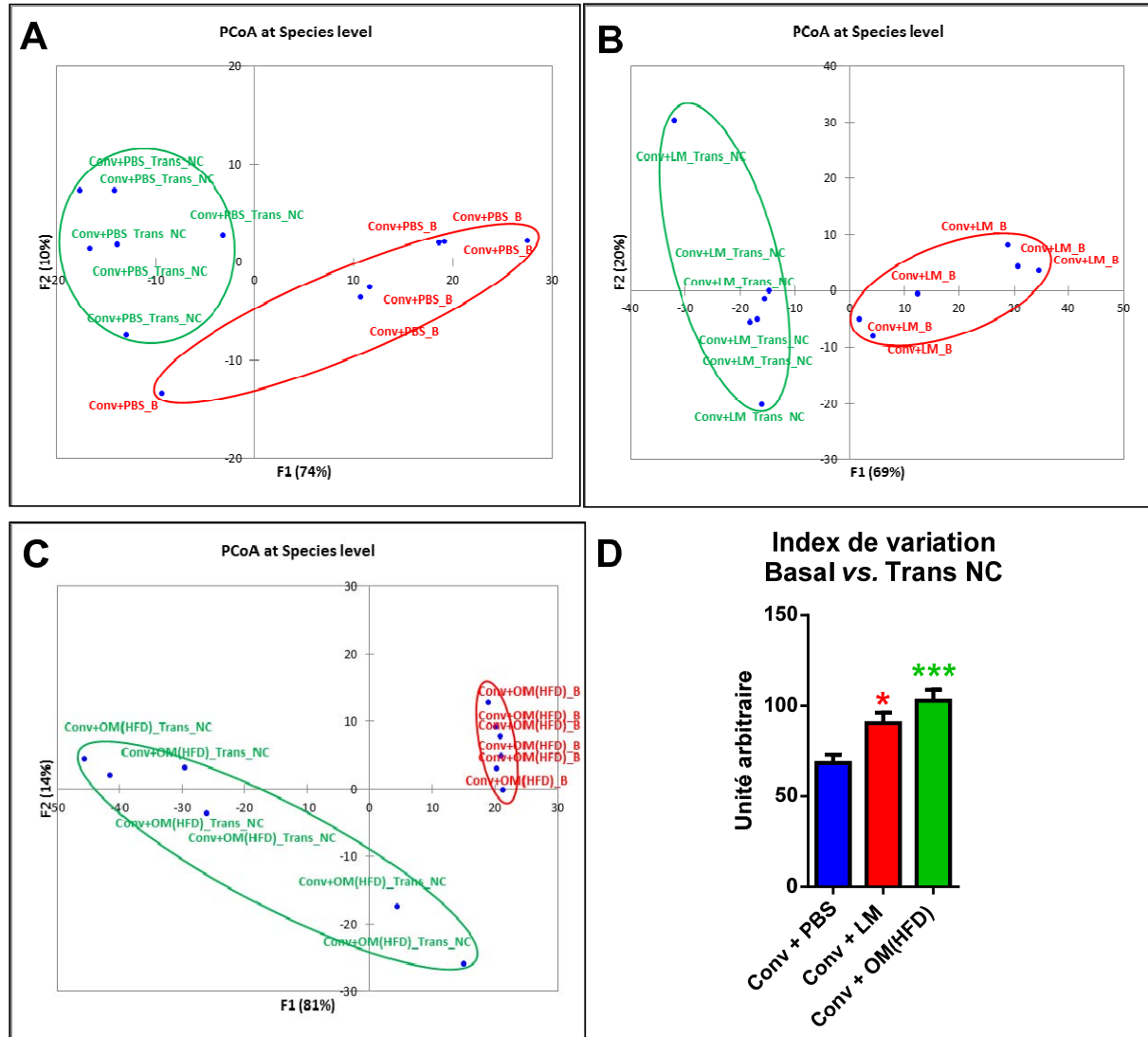


Figure 33: Analyse des modifications du microbiote fécal prélevé avant et après le transfert de microbiote pour les trois groupes de souris Conv + PBS, Conv + LM et Conv + OM(HFD) lors du protocole #1.

Deux groupes de 6 souris mâles ont reçu par gavage le microbiote caecal de souris minces nourries avec un régime normal (groupe Conv + LM) ou le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques nourries avec un régime hyperlipidique (groupe Conv + OM(HFD)). Le groupe de 6 souris contrôles a reçu du PBS anaérobie par gavage (groupe Conv + PBS). L'ensemble des résultats présentés sur la figure a été généré à partir des données obtenues par pyroséquençage du microbiote fécal prélevé en condition basale (avant le transfert caecal) et Trans NC (3 semaines après le transfert caecal). (A) Analyse en coordonnées principales (PCoA) du profil du microbiote intestinal des souris Conv + PBS avant et après le transfert de microbiote. L'analyse en coordonnées principales permet d'apprécier ici la distribution spatiale des différentes souris sur un graphique à 2 dimensions. Chaque point de couleur rouge ou vert représente une souris. Chaque souris apparaît 2 fois sur le graphique (un point rouge pour la condition basale (B) et un point vert pour la condition 3 semaines après le transfert caecal (Trans NC)). Plus les souris sont éloignées l'une de l'autre sur le graphique moins leur microbiote présente des similitudes. Le logiciel ne tient pas compte du groupe d'appartenance de la souris pour faire l'analyse, les couleurs et les cercles sont positionnés après l'analyse. (B) Analyse en coordonnées principales (PCoA) du profil du microbiote intestinal des souris Conv + LM avant et après le transfert de microbiote. (C) Analyse en coordonnées principales (PCoA) du profil du microbiote intestinal des souris Conv + OM(HFD) avant et après le transfert de microbiote. (D) Index relatif quantifiant le degré de variabilité du microbiote intestinal entre la condition basale et Trans NC pour les 3 groupes de souris. Les résultats ont été exprimés en valeurs moyennes \pm l'écart standard à la moyenne (S.E.M). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ au test one-way ANOVA avec un post-test de Dunnett. Les groupes traités ont été comparés au groupe Conv + PBS.

Par la suite, nous nous sommes focalisés sur les noms des espèces bactériennes significativement modifiées entre la condition basale et Trans NC pour les 3 groupes d'études. Pour les 3 groupes de souris plusieurs dizaines de groupes bactériens ont été identifiés comme significativement modifiés entre la condition basale et Trans NC (**Fig. 34, 35 et 36**). Ces résultats confirment la distribution spatiale des souris observée lors de l'analyse en coordonnées principales (**Fig. 33, A-C**). En outre, parmi tous ces groupes bactériens modifiés, nous avons observé une augmentation significative du genre bactérien *Allobaculum* chez les souris Conv + OM(HFD) (**Fig. 36, r**).

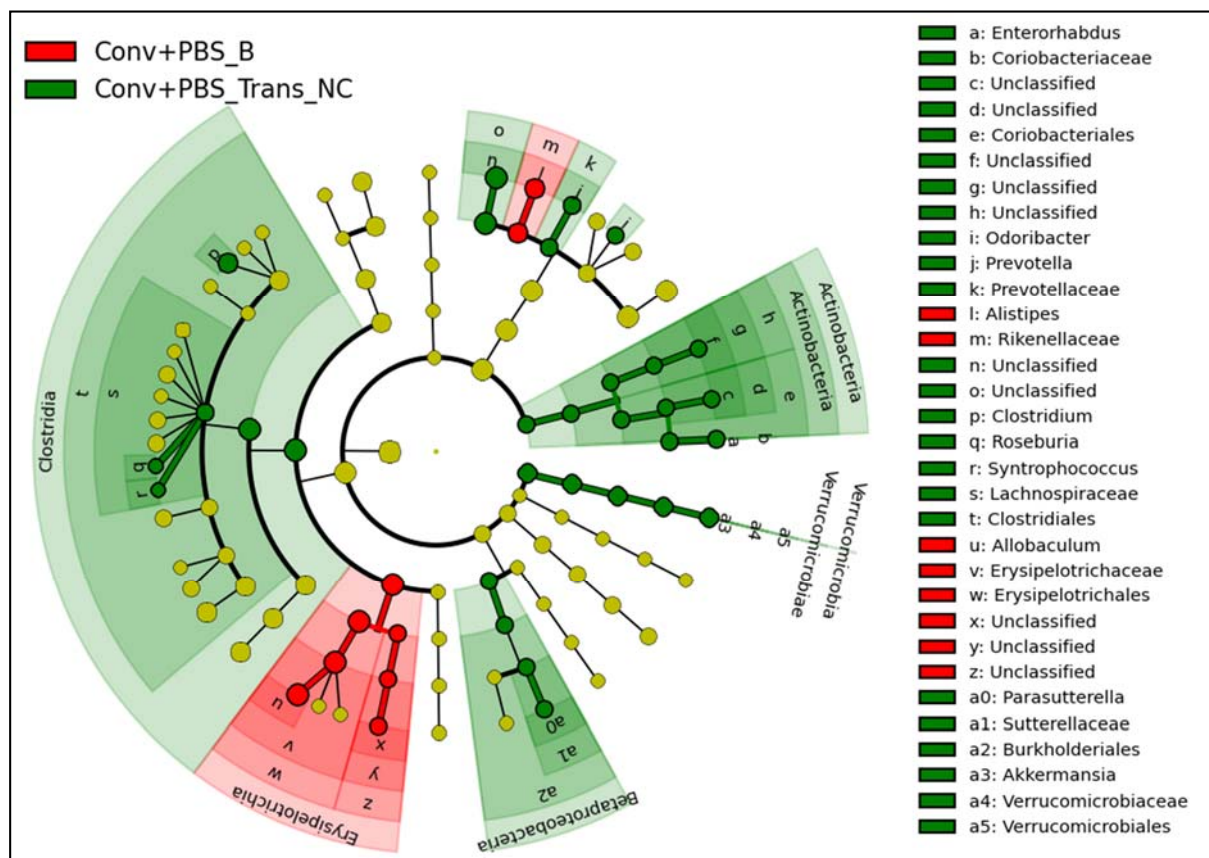


Figure 34: Groupes bactériens significativement différents entre le microbiote des souris Conv + PBS en condition basale et Trans NC lors du protocole #1.

La représentation en Cladogramme a été générée à partir des données obtenues par pyroséquençage sur le logiciel LEfSe. Le rond jaune au centre du graphique représente le règne des bactéries. Ensuite ce graphique est constitué de 5 cercles excentriques successifs sur lesquels sont disposés des ronds. Chaque cercle représente un niveau de classification taxonomique (du centre vers l'extrémité : phylum, classe, ordre, famille et genre) et chaque rond représente soit un phylum, une classe, un ordre, une famille ou un genre différent en fonction du cercle sur lequel il se trouve. Par exemple, chaque rond disposé sur le cercle des phyla représente un phylum différent. Les ronds surlignés en vert correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée en condition Trans NC comparativement à la condition basale (B). Les ronds surlignés en rouge correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée en condition basale comparativement à la condition Trans NC. Les prélèvements en condition basale et Trans NC ont été effectués chez les mêmes souris du groupe Conv + PBS (n=6).

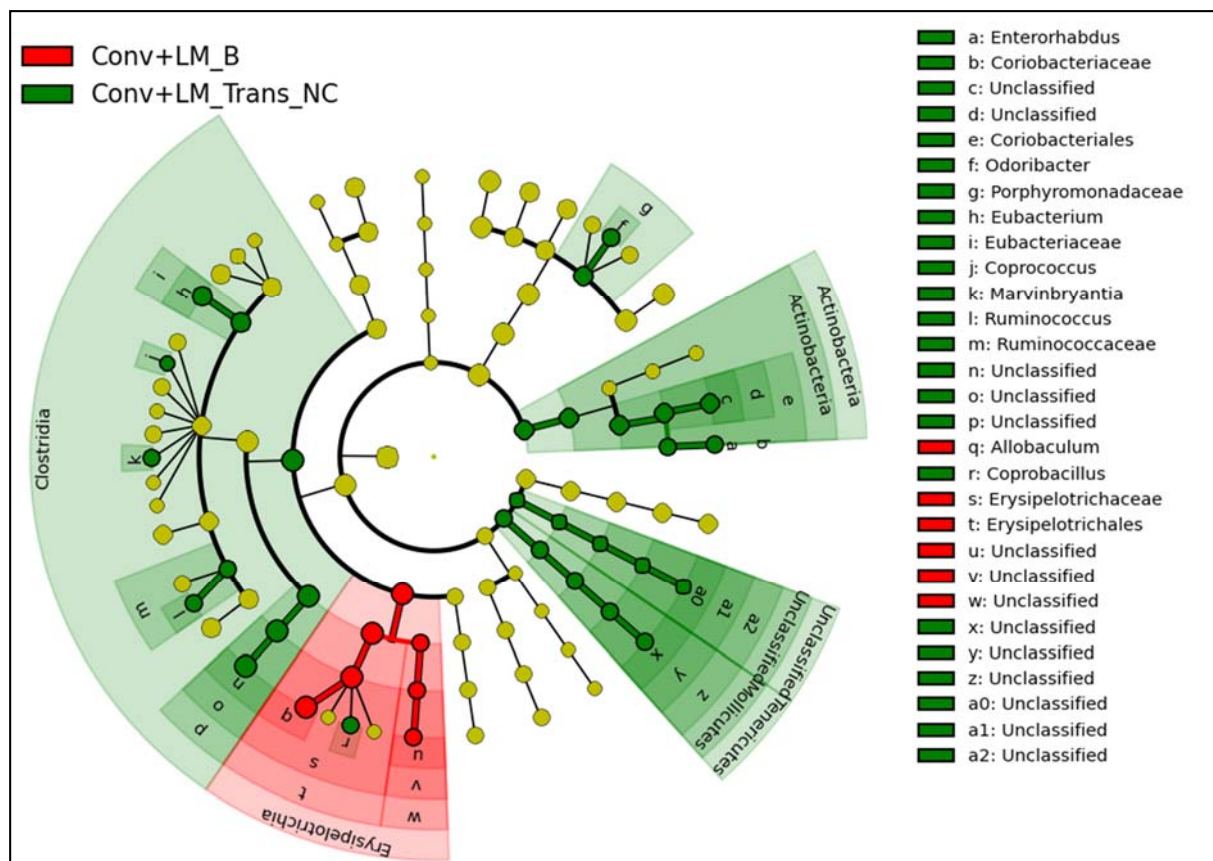


Figure 35: Groupes bactériens significativement différents entre le microbiote des souris Conv + LM en condition basale et Trans NC lors du protocole #1.

La représentation en Cladogramme a été générée à partir des données obtenues par pyroséquençage sur le logiciel LEfSe. Le rond jaune au centre du graphique représente le règne des bactéries. Ensuite ce graphique est constitué de 5 cercles excentriques successifs sur lesquels sont disposés des ronds. Chaque cercle représente un niveau de classification taxonomique (du centre vers l'extrémité : phylum, classe, ordre, famille et genre) et chaque rond représente soit un phylum, une classe, un ordre, une famille ou un genre différente en fonction du cercle sur lequel il se trouve. Par exemple, chaque rond disposé sur le cercle des phyla représente un phylum différent. Les ronds surlignés en vert correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée en condition Trans NC comparativement à la condition basale (B). Les ronds surlignés en rouge correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée en condition basale comparativement à la condition Trans NC. Les prélèvements en condition basale et Trans NC ont été effectués chez les mêmes souris du groupe Conv + LM (n=6).

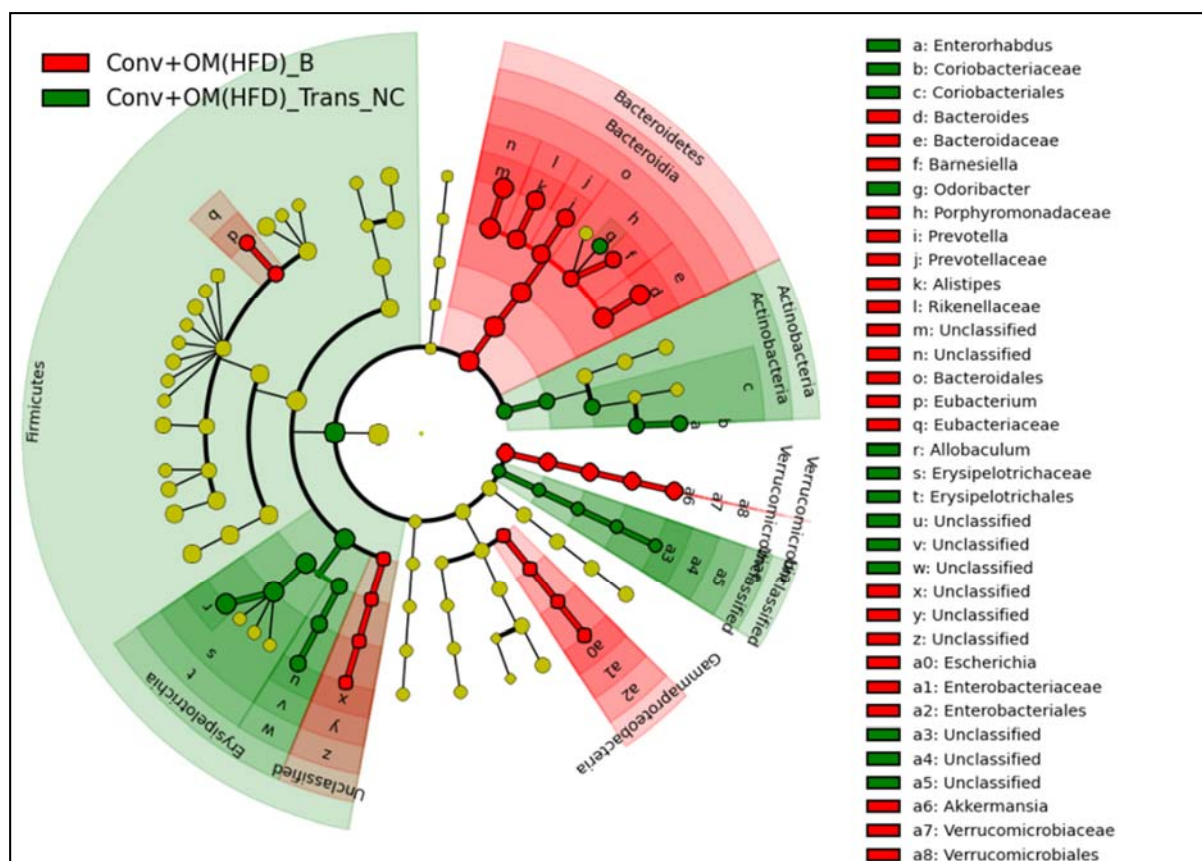


Figure 36: Groupes bactériens significativement différents entre le microbiote des souris Conv + OM(HFD) en condition basale et Trans NC lors du protocole #1.

La représentation en Cladogramme a été générée à partir des données obtenues par pyroséquençage sur le logiciel LEfSe. Le rond jaune au centre du graphique représente le règne des bactéries. Ensuite ce graphique est constitué de 5 cercles excentriques successifs sur lesquels sont disposés des ronds. Chaque cercle représente un niveau de classification taxonomique (du centre vers l'extrémité : phylum, classe, ordre, famille et genre) et chaque rond représente soit un phylum, une classe, un ordre, une famille ou un genre différente en fonction du cercle sur lequel il se trouve. Par exemple, chaque rond disposé sur le cercle des phyla représente un phylum différent. Les ronds surlignés en vert correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée en condition Trans NC comparativement à la condition basale (B). Les ronds surlignés en rouge correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée en condition basale comparativement à la condition Trans NC. Les prélèvements en condition basale et Trans NC ont été effectués chez les mêmes souris du groupe Conv + OM(HFD) (n=6).

Enfin, l'analyse PICRUST des données de séquençage bactérien nous a permis de mettre en évidence les différentes voies métaboliques modifiées dans le microbiote des 3 groupes de souris. Nous avons pu mettre en évidence 3 fonctions significativement modifiées entre les conditions basale et Trans NC pour les groupes Conv + PBS et Conv + LM (**Fig. 37, A-B**). Pour le groupe Conv + OM(HFD), 20 voies métaboliques ont été significativement modulées (**Fig. 37, C**), ce qui suggère que le transfert d'un microbiote des souris OM(HFD) a induit des modifications fonctionnelles du microbiote plus importantes que le transfert d'un microbiote issu de souris mince (LM).

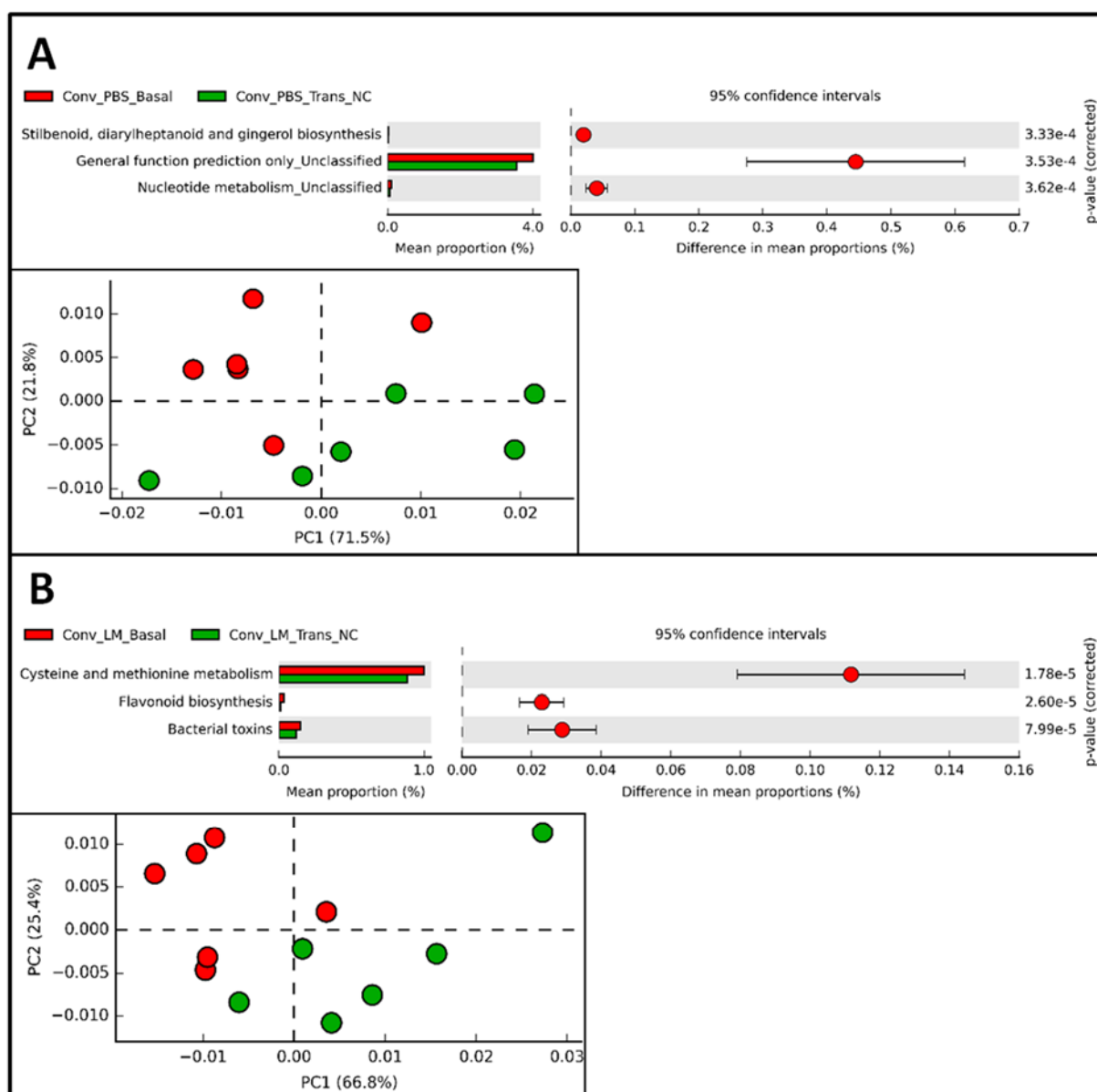


Figure 37 (A et B): Analyses prédictives des fonctions microbiennes significativement modifiées avant et après le transfert de microbiote chez les souris Conv +PBS et Conv + LM lors du protocole #1.

Deux groupes de 6 souris mâles ont reçu par gavage le microbiote caecal de souris minces nourries avec un régime normal (groupe Conv + LM) ou le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques nourries avec un régime hyperlipidique (groupe Conv + OM(HFD)). Le groupe de 6 souris contrôles a reçu du PBS anaérobie par gavage (groupe Conv + PBS). L'ensemble des résultats présentés sur la figure a été généré à partir des données obtenues par le pyroséquençage du microbiote fécal prélevé en condition basale (avant le transfert caecal) et Trans NC (3 semaines après le transfert caecal). Une analyse prédictive des fonctions bactériennes potentiellement modifiées entre la condition basale (avant le transfert caecal) et Trans NC (après le transfert caecal) a été effectuée par le logiciel PICRUST. (A) Fonctions bactériennes significativement modulées chez le groupe Conv + PBS et représentation en analyse en composantes principales (PCA) de la distribution des souris dans l'espace, en fonction des modifications des voies métaboliques bactériennes obtenues par PICRUST. (B) Représentations similaires des données PICRUST pour le groupe Conv + LM.

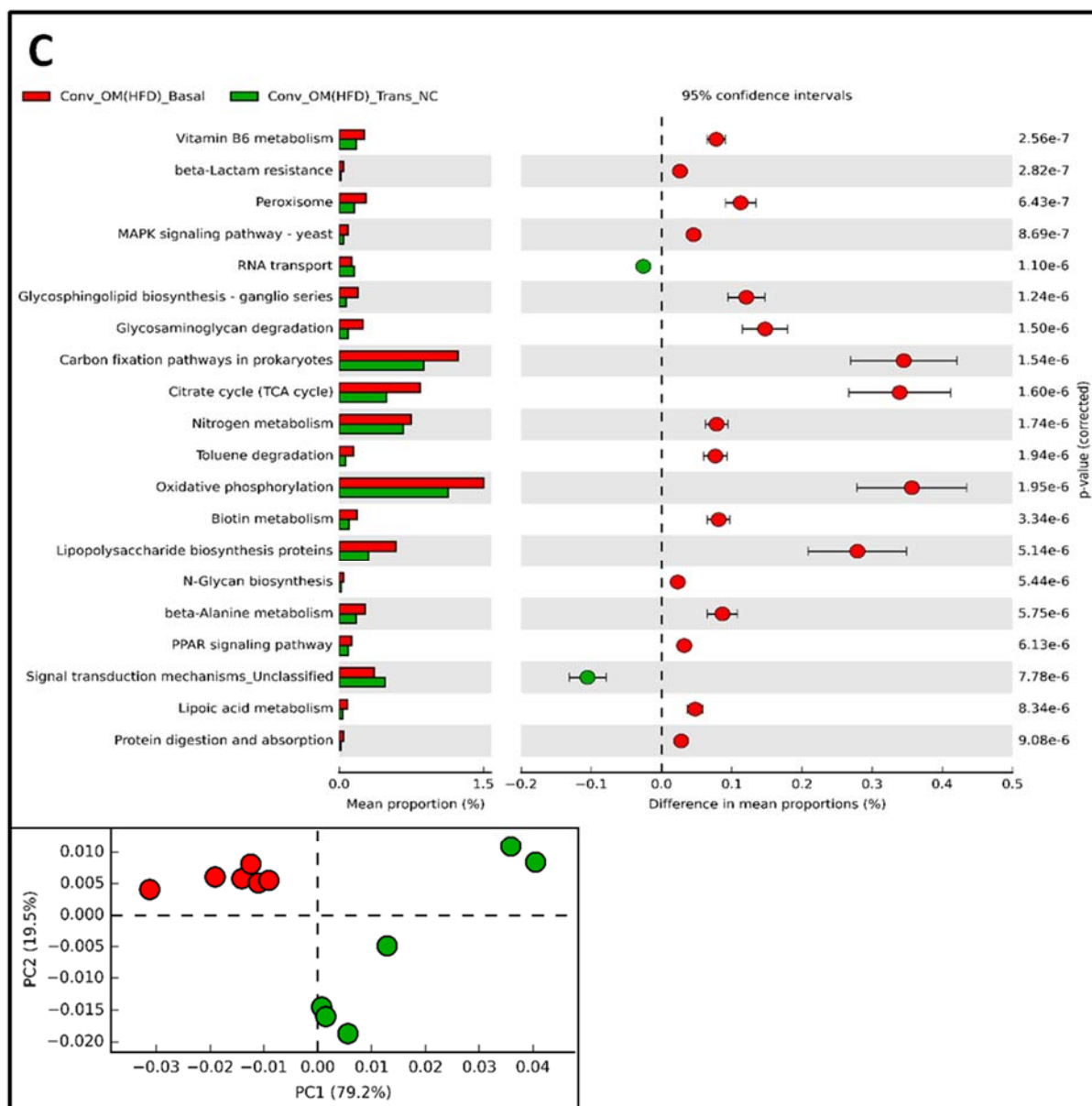


Figure 37 (C): Analyses prédictives des fonctions microbiennes significativement modifiées entre avant et après le transfert de microbiote chez le groupe Conv +OM(HFD) lors du protocole #1.

(C) Fonctions bactériennes significativement modulées chez le groupe Conv + OM(HFD) entre des conditions basale et Trans NC et représentation en analyse en composantes principales (PCA) de la distribution des souris dans l'espace en fonction des modifications des voies métaboliques bactériennes obtenues par PICRUST.

B. Comparaison du microbiote fécal entre les 3 groupes de souris

Dans le paragraphe précédent nous avons analysé au sein d'un même groupe de souris les variations du microbiote intestinal entre la condition basale et Trans NC. Dans ce chapitre nous allons comparer le microbiote des différents groupes de souris receveuses entre eux avant et après le transfert caecal.

Dans un premier temps et de manière surprenante nous avons constaté des différences taxonomiques significatives entre les 3 groupes de souris avant le transfert caecal (condition basale) (**Fig. 38, A, B**). Comme attendu, les microbiotes des 3 groupes de souris ont également présenté des différences significatives après le transfert caecal (**Fig. 39, A, B**). L'analyse en coordonnées principales des microbiotes des souris après le transfert caecal montre également que 4 des 6 souris ayant reçu le microbiote OM(HFD) ont un microbiote nettement différent de l'ensemble des autres souris (**PCoA, Fig. 39, A**).

D'un point de vue fonctionnel nous avons également retrouvé différentes voies métaboliques significativement modulées avant et après le transfert caecal (**Fig. 40 et Fig. 41**). Les analyses PICRUSt effectuées après le transfert caecal révèlent une séparation franche entre les fonctions microbiennes exercées par le microbiote des souris Conv + OM(HFD) et les fonctions microbiennes 2 autres groupes de souris (**PCoA, Fig. 41, A**). Les 3 groupes de souris receveuses avaient donc des microbiotes taxonomiquement et fonctionnellement différents au moment des analyses du métabolisme hépatique. Parmi ces voies microbiennes modifiées, nous avons constaté une augmentation significative du métabolisme du glyoxylate et du cycle de Krebs dans le microbiote des souris Conv + OM(HFD) comparativement aux souris Conv + PBS (**Fig. 41, C**).

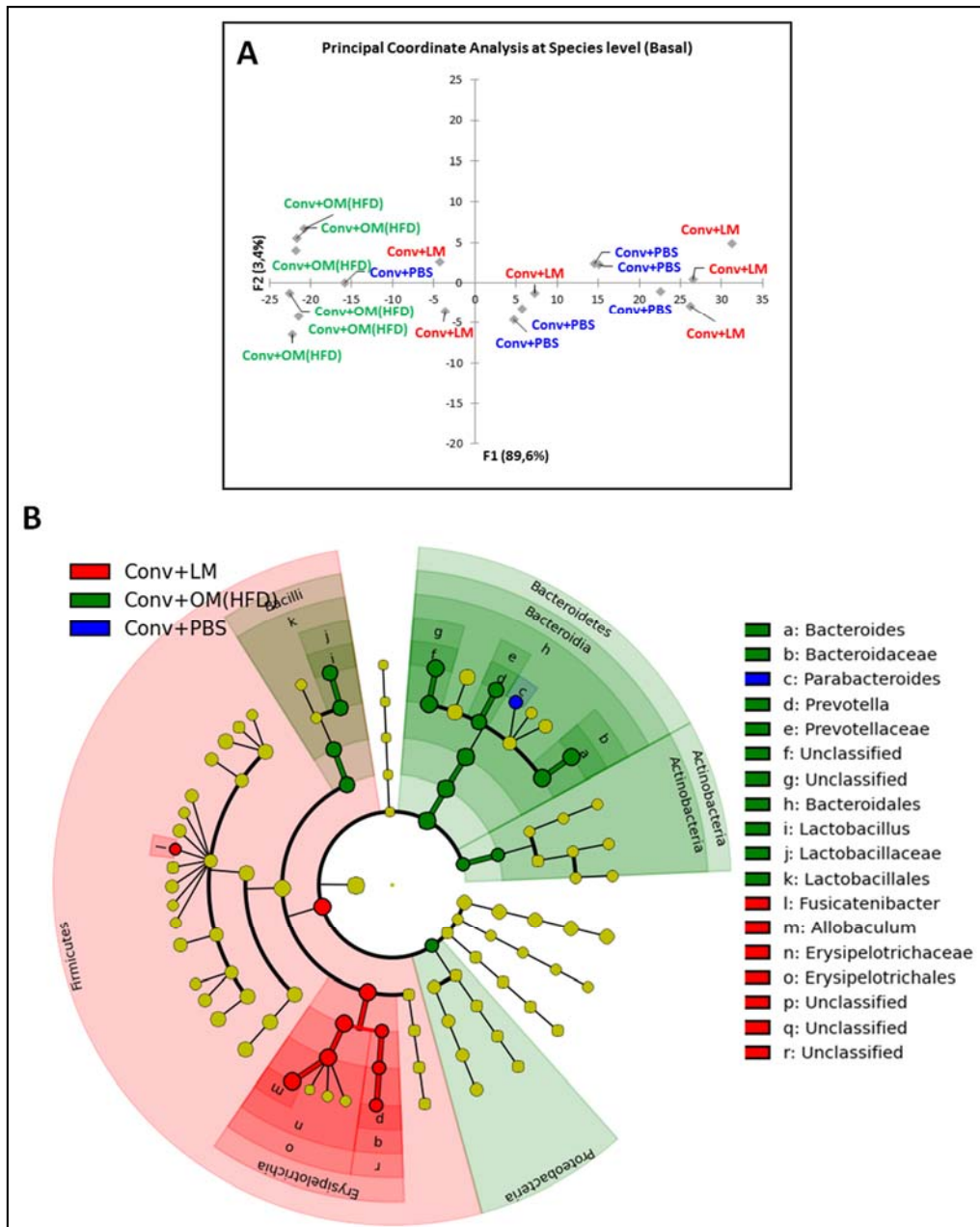


Figure 38: Analyse des différences présentes avant le transfert de microbiote (condition basale) entre le microbiote des 3 groupes de souris Conv + PBS, Conv + LM et Conv + OM(HFD) lors du protocole #1.

L'ensemble des résultats présentés sur la figure a été généré à partir des données obtenues par le pyroséquençage du microbiote fécal prélevé en condition basale (avant le transfert caecal). **(A)** Analyse en coordonnées principales (PCoA) du profil du microbiote intestinal des 3 groupes de souris (Conv + PBS, Conv + LM et Conv + OM(HFD)). **(B)** Représentation en Cladogramme générée à partir des données obtenues par pyroséquençage sur le logiciel LEfSe. Le rond jaune au centre du graphique représente le règne des bactéries. Ensuite ce graphique est constitué de 5 cercles excentriques successifs sur lesquels sont disposés des ronds. Chaque cercle représente un niveau de classification taxonomique (du centre vers l'extrémité : phylum, classe, ordre, famille et genre) et chaque rond représente soit un phylum, une classe, un ordre, une famille ou un genre différent en fonction du cercle sur lequel il se trouve. Par exemple, chaque rond disposé sur le cercle des phyla représente un phylum différent. Les ronds surlignés en vert correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée dans le groupe Conv + OM(HFD) comparativement aux deux autres groupes Conv + PBS et Conv + LM. Les ronds surlignés en rouge correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée dans le groupe Conv + LM comparativement aux 2 autres groupes Conv + PBS et Conv + OM(HFD). Les ronds surlignés en bleu correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée dans le groupe Conv + PBS comparativement aux 2 autres groupes Conv + LM et Conv + OM(HFD). (n=6 souris par groupe).

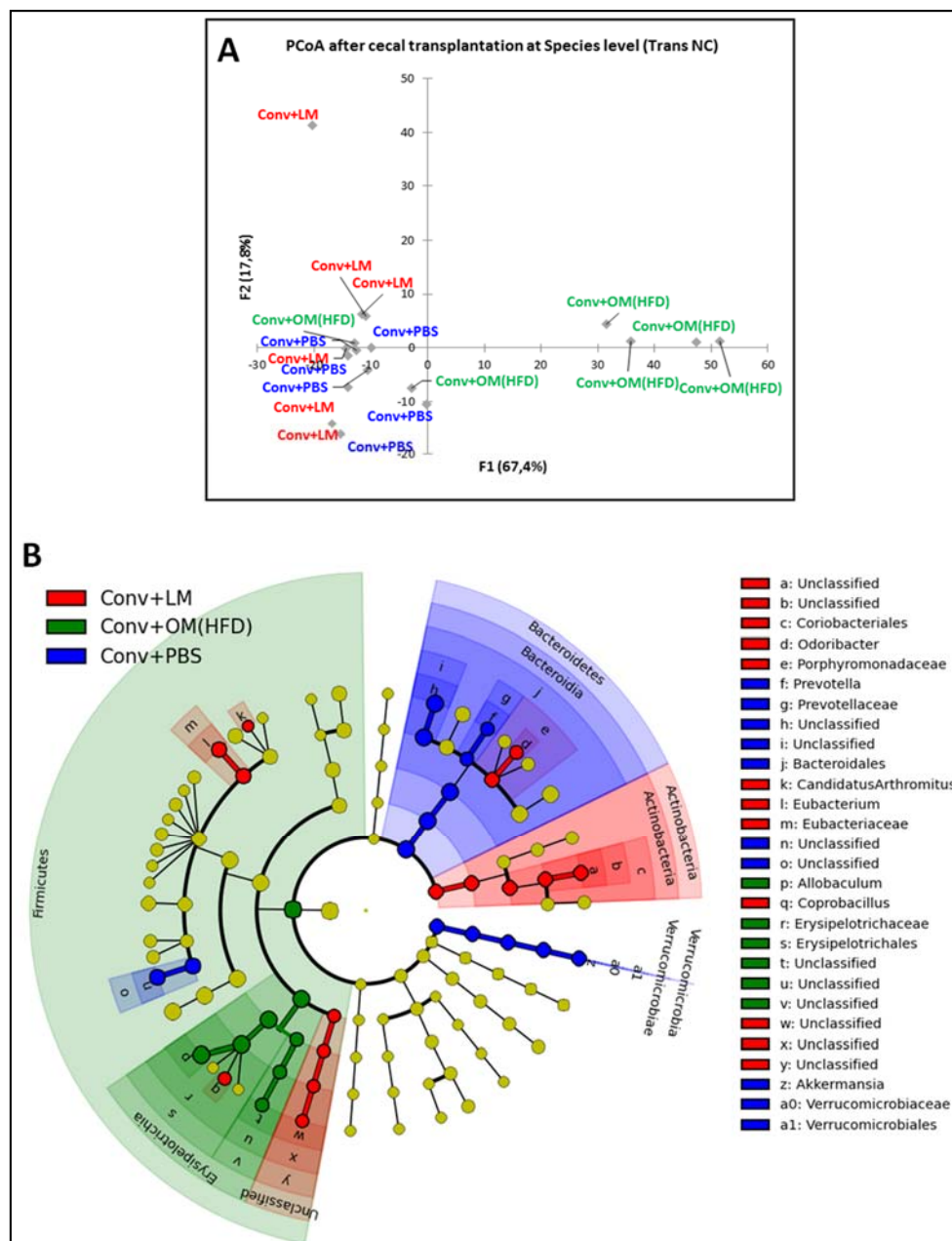


Figure 39: Analyse des différences présentes après le transfert de microbiote (condition Trans NC) entre le microbiote des 3 groupes de souris Conv + PBS, Conv + LM et Conv + OM(HFD) lors du protocole #1.

L'ensemble des résultats présentés sur la figure a été généré à partir des données obtenues par le pyroséquençage du microbiote fécal prélevé 3 semaines après le transfert caecal (Trans NC). **(A)** Analyse en coordonnées principales (PCoA) du profil du microbiote intestinal des 3 groupes de souris (Conv + PBS, Conv + LM et Conv + OM(HFD)). **(B)** Représentation en Cladogramme générée à partir des données obtenues par pyroséquençage sur le logiciel LefSe. Le rond jaune au centre du graphique représente le règne des bactéries. Ensuite ce graphique est constitué de 5 cercles excentriques successifs sur lesquels sont disposés des ronds. Chaque cercle représente un niveau de classification taxonomique (du centre vers l'extrémité : phylum, classe, ordre, famille et genre) et chaque rond représente soit un phylum, une classe, un ordre, une famille ou un genre différent en fonction du cercle sur lequel il se trouve. Par exemple, chaque rond disposé sur le cercle des phyla représente un phylum différent. Les ronds surlignés en vert correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée dans le groupe Conv + OM(HFD) comparativement aux deux autres groupes Conv + PBS et Conv + LM. Les ronds surlignés en rouge correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée dans le groupe Conv + LM comparativement au 2 autres groupes Conv + PBS et Conv + OM(HFD). Les ronds surlignés en bleu correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée dans le groupe Conv + PBS comparativement aux 2 autres groupes Conv + LM et Conv + OM(HFD). (n=6 souris par groupe).

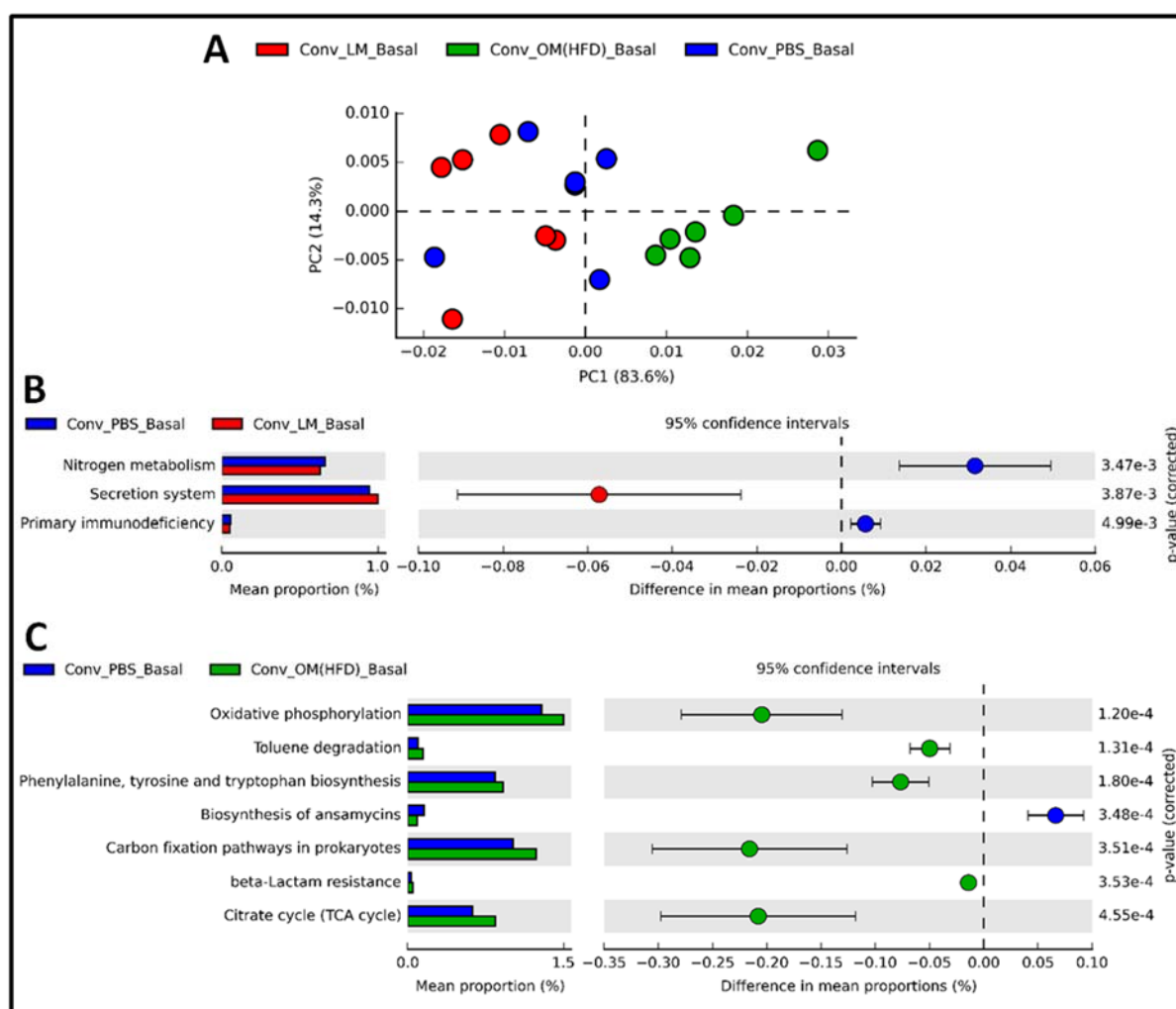


Figure 40: Analyses prédictives des fonctions microbiennes significativement modifiées entre les 3 groupes de souris Conv + PBS, Conv + LM et Conv + OM(HFD) en condition basale lors du protocole #1.

L'ensemble des résultats présentés sur la figure a été généré à partir des données obtenues par le pyroséquençage du microbiote fécal prélevé en condition basale (avant le transfert caecal). Une analyse prédictive des fonctions bactériennes potentiellement modifiées en condition basale (avant le transfert caecal) entre les 3 groupes de souris Conv + PBS, Conv + LM et Conv + OM(HFD) a été effectuée par le logiciel PICRUSt. **(A)** Représentation en analyse en composantes principales (PCA) de la distribution des souris dans l'espace en fonction des modifications des voies métaboliques bactériennes obtenues par PICRUSt. **(B)** Fonctions bactériennes significativement modulées entre les groupe Conv + PBS et Conv + LM **(C)** Fonctions bactériennes significativement modulées entre les groupe Conv + PBS et Conv + OM(HFD) (n=6 souris par groupe).

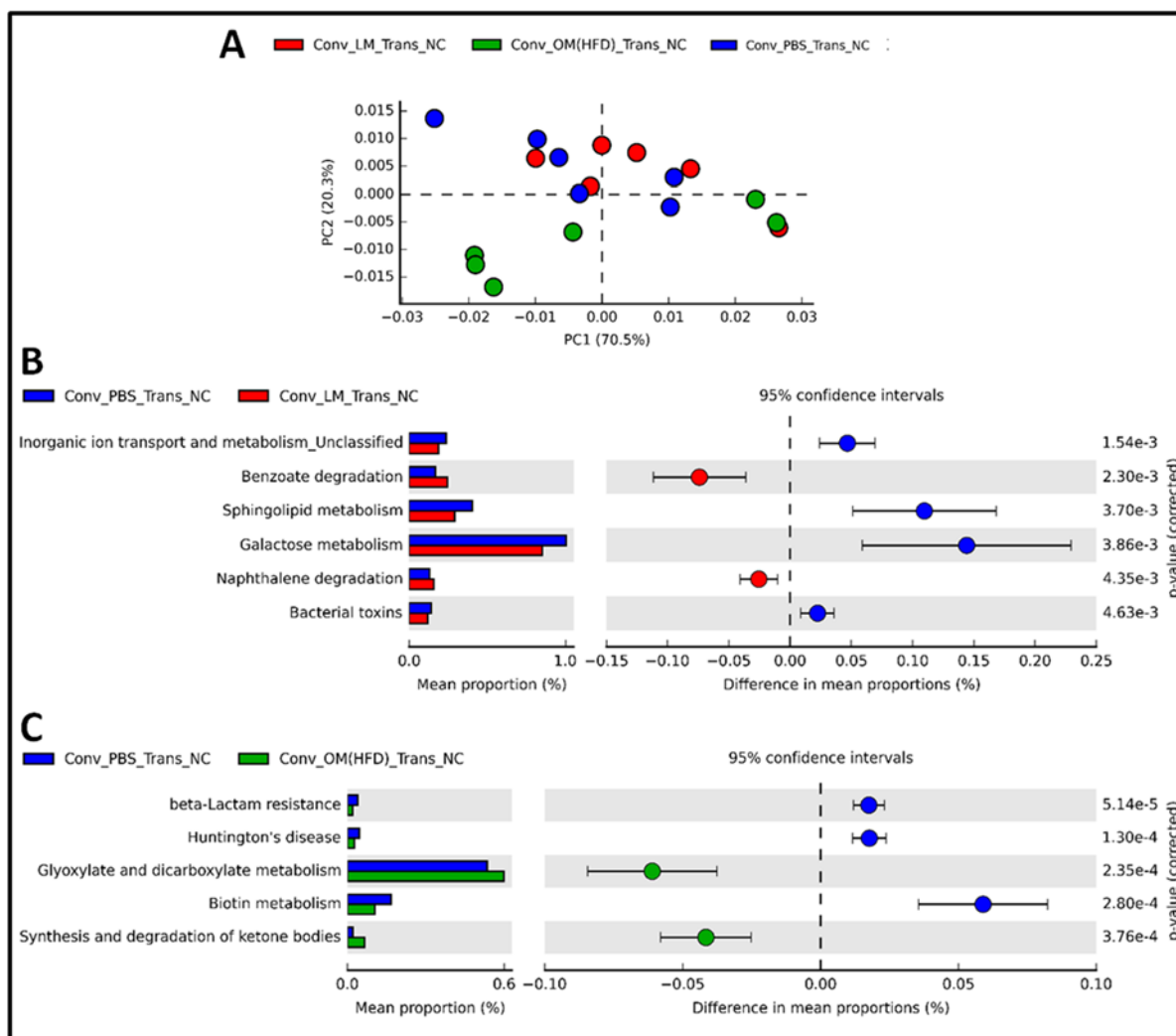


Figure 41: Analyses prédictives des fonctions microbiennes significativement modifiées entre les 3 groupes de souris Conv + PBS, Conv + LM et Conv + OM(HFD) après le transfert de microbiote lors du protocole #1.

L'ensemble des résultats présentés sur la figure a été généré à partir des données obtenues par le pyroséquençage du microbiote fécal prélevé 3 semaines après le transfert caecal (Trans NC). Une analyse prédictive des fonctions bactériennes potentiellement modifiées 3 semaines après le transfert caecal (Trans NC) entre les 3 groupes de souris Conv + PBS, Conv + LM et Conv + OM(HFD) a été effectuée par le logiciel PICRUSt. (A) Représentation en analyse en composantes principales (PCA) de la distribution des souris dans l'espace en fonction des modifications des voies métaboliques bactériennes obtenues par PICRUSt. (B) Fonctions bactériennes significativement modulées entre les groupe Conv + PBS et Conv + LM (C) Fonctions bactériennes significativement modulées entre les groupe Conv + PBS et Conv + OM(HFD) (n=6 souris par groupe).

IV- Impact du transfert du microbiote OM(HFD) et OM(ob) sur le métabolisme des souris receveuses nourries avec un régime hyperlipidique

Dans l'article publié par le laboratoire de J.I. Gordon en 2006, les auteurs ont constaté des modifications du microbiote intestinal chez les souris obèses et diabétiques invalidées pour le gène codant pour la leptine (souris ob/ob). Lors de ma thèse, nous avons voulu évaluer si le transfert de ce microbiote modifié était capable, comme le microbiote issu de souris nourries avec un régime hyperlipidique, de modifier le métabolisme hépatique des souris receveuses conventionnelles. Nous avons donc transféré des souris mâles avec le microbiote caecal de souris obèses nourries avec un régime hyperlipidique pendant 3 mois (microbiote OM(HFD) avec OM pour Obese Microbiota et HFD pour High Fat Diet) ou le microbiote de souris ob/ob nourries avec régime normal (Microbiote OM(ob) avec OM pour Obese Microbiota et ob pour ob/ob). Nous avons comparé les 2 groupes de souris transplantées (Conv + OM(HFD) et Conv + OM(ob)) avec 1 groupe de souris non transplantée Conv + PBS. La méthode de transfert de microbiote a été la même que celle utilisée lors du **protocole #1**. Le **protocole #2** est expliqué et détaillé dans la **figure 42**.

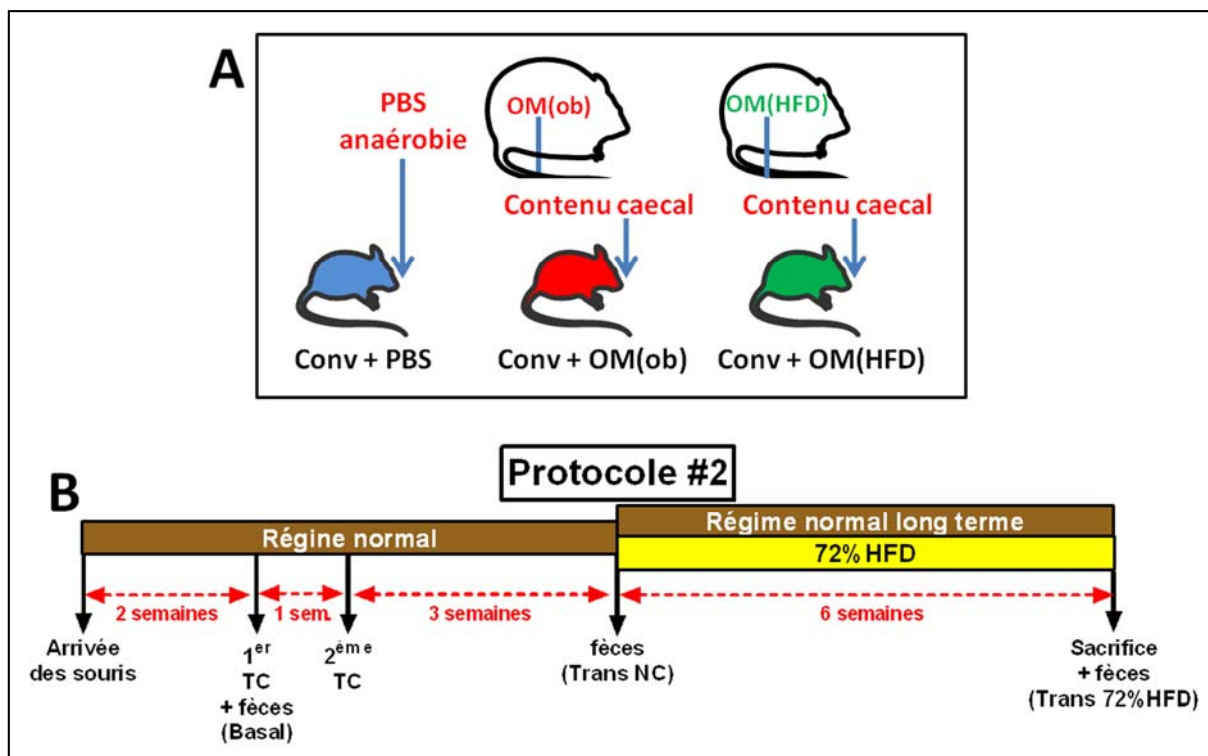


Figure 42: Schéma du protocole expérimental #2.

(A) Des souris mâles C57Bl/6J âgées de 6 semaines ont reçu par gavage le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques nourries avec un régime hyperlipidique pendant 3 mois (groupe Conv + OM(HFD) avec Conv pour conventionnelle, OM pour Obese Microbiota et HFD pour High Fat Diet), ou le microbiote de souris ob/ob nourries avec un régime normal (groupe Conv + OM(ob) avec Conv pour conventionnelle, OM pour Obese Microbiota et ob pour ob/ob). Le groupe de souris contrôles a reçu du PBS anaérobie par gavage (groupe Conv + PBS). (B) Le microbiote des souris donneuses a été administré à 2 reprises espacées d'une semaine (1^{er} TC signifie 1^{er} Transfert Caecale et 2^{ème} TC signifie 2^{ème} Transfert Caecal). Trois semaines après le deuxième gavage, des analyses métaboliques ont été effectuées chez les souris receveuses. Ensuite les souris ont été nourries avec un régime hyperlipidique pendant 6 semaines (72% HFD; 72% lipides, 28% de protéines et moins de 1% glucides, SAFE, Augy, France) ou maintenues sous régime normal pendant la même période (Régime normal long terme). Les souris ont ensuite été sacrifiées. Le microbiote contenu dans les fèces a été analysé par pyroséquence à 3 reprises: juste avant le transfert caecal (Basal), 3 semaines après le transfert caecal (Trans NC avec NC pour Normal Chow) et 6 semaines après le régime hyperlipidique (Trans 72%HFD avec HFD pour High Fat Diet).

Dans un premier temps nous avons confirmé les résultats obtenus lors du **protocole #1**. En effet, nous avons mesuré une conversion du pyruvate en glucose significativement plus faible chez le groupe de souris Conv + OM(HFD) comparativement à celle mesurée chez le groupe Conv + PBS (**Fig. 43, A**). De manière intéressante, les souris ayant reçu le microbiote OM(ob) ont développé un phénotype similaire que les souris Conv + OM(HFD) (**Fig. 43, A**).

Par la suite, nous nous sommes demandés si la diminution de conversion du pyruvate en glucose observé chez les souris transplantées perdurait au cours du temps. Nous avons donc mesuré la tolérance au pyruvate chez les 3 groupes de souris 9 semaines après le transfert de microbiote. Après 9 semaines, les effets du transfert de microbiote n'ont plus été observés quelle que soit l'origine du microbiote obèse (souris HFD vs. souris ob/ob) (**Fig. 43, B**). Ces résultats sous entendent que l'effet du transfert de microbiote obèse sur la tolérance du pyruvate est un effet à court terme et que celui-ci s'estompe avec le temps.

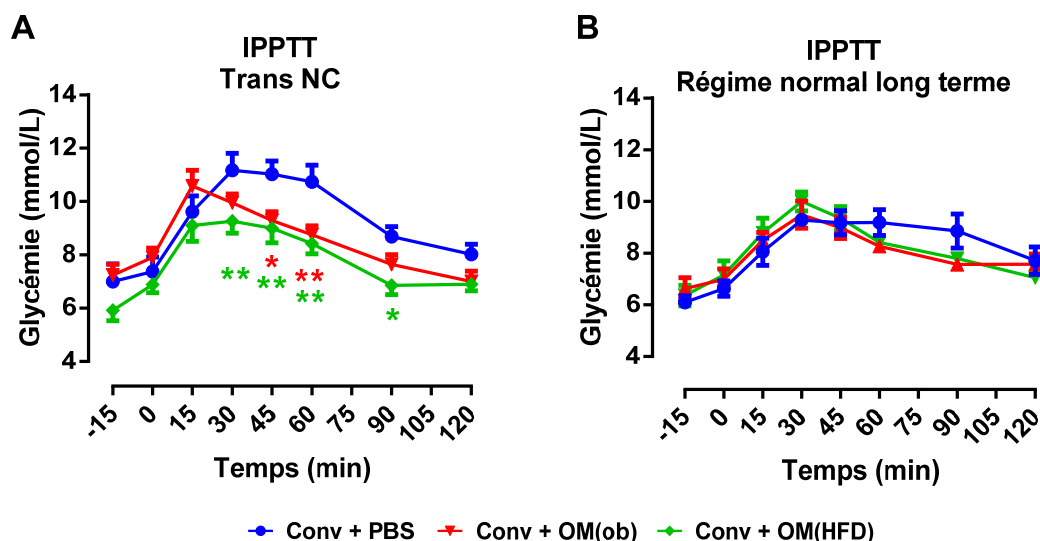


Figure 43: Mesure de la tolérance au pyruvate chez les souris receveuses Conv + OM(HFD) et Conv + OM(ob) nourries avec un régime normal.

Deux groupes de 6 souris mâles ont reçu par gavage le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques ob/ob nourries avec un régime normal (groupe Conv + OM(ob) en rouge) ou le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques nourries avec un régime hyperlipidique (groupe Conv + OM(HFD) en vert). Le groupe de 5 souris contrôles a reçu du PBS anaérobie par gavage (groupe Conv + PBS en bleu). (A) Trois semaines après le 2^{ème} transfert caecal (Trans NC), un test de tolérance au pyruvate a été effectué. (B) Neuf semaines après le 2^{ème} transfert caecal (Régime normal long terme), un test de tolérance au pyruvate a été à nouveau effectué. Les résultats ont été exprimés en valeurs moyennes \pm l'écart standard à la moyenne (S.E.M). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ au test two-way ANOVA avec un post-test de Dunnett. Les groupes traités ont été comparés au groupe Conv + PBS.

Nous nous sommes ensuite demandés si la diminution des marqueurs de la néoglucogenèse hépatique observés lors du transfert d'un microbiote obèse pouvait protéger les souris transplantées de l'augmentation de néoglucogenèse hépatique normalement induite par la consommation d'un régime hyperlipidique. Dans cette optique, nous avons nourri les souris transplantées avec un régime riche en graisses et dépourvu de sucres afin d'induire une intolérance au glucose et une augmentation massive de la néoglucogenèse hépatique. Chez des souris nourries avec ce régime, l'absorption intestinale de glucose est presque nulle (le régime en contient moins de 1%) et la glycémie est le reflet de la production endogène de glucose. Après 6 semaines de régime hyperlipidique, nous avons mesuré une glycémie en condition nourrie significativement plus faible chez les souris Conv + OM(HFD) comparativement au groupe Conv + PBS (**Fig. 44, A**). Ce résultat n'est pas dû à une augmentation de la sécrétion d'insuline puisque les 3 groupes de souris ont un niveau d'insuline plasmatique comparable (**Fig. 44, B**). De plus, la glycémie est également plus faible chez le groupe Conv + OM(HFD) après 6 heures de jeûne (**Fig. 44, C**). Comme nous l'avons observé 3 semaines après le transfert de microbiote, les 2 groupes de souris Conv + OM(HFD) et Conv + OM(ob) ont également une glycémie plus faible lors du test de tolérance au pyruvate une fois nourries avec un régime hyperlipidique (**Fig. 44, D**). La voie de signalisation du glucagon ne semble pas être impliquée dans la baisse de la néoglucogenèse hépatique puisque l'état de phosphorylation des substrats de la PKA n'est pas modifié entre les groupes (**Fig. 44, E**). Par contre, nous avons mesuré par western blot une quantité significativement plus faible de l'enzyme PEPCCK ainsi qu'une tendance à une diminution de la quantité de G6Pase dans les 2 groupes de souris transplantées comparativement au groupe

contrôle (**Fig. 44, E**). La diminution de la quantité de ces enzymes néoglucogéniques est également associée à une diminution de leur activité. En effet, l'activité de la PEPCK est significativement diminuée dans le groupe Conv + OM(ob) et celle de la G6Pase est significativement diminuée dans le groupe Conv + OM(HFD) (**Fig. 44, F-G**). Ces résultats ne sont pas associés avec des modifications significatives du poids du foie, de son contenu en triglycérides et des taux plasmatiques des transaminases (**Fig. 45, A-D**).

L'ensemble de ces résultats indique que le transfert d'un microbiote issu de souris obèses/diabétiques (HFD et ob/ob) s'oppose à l'augmentation de néoglucogenèse hépatique normalement induite par un régime hyperlipidique. Ces modifications du métabolisme glucidique hépatique ne sont pas associées avec des modifications des taux plasmatiques des transaminases suggérant une absence de détérioration des hépatocytes et donc de la fonction hépatique.

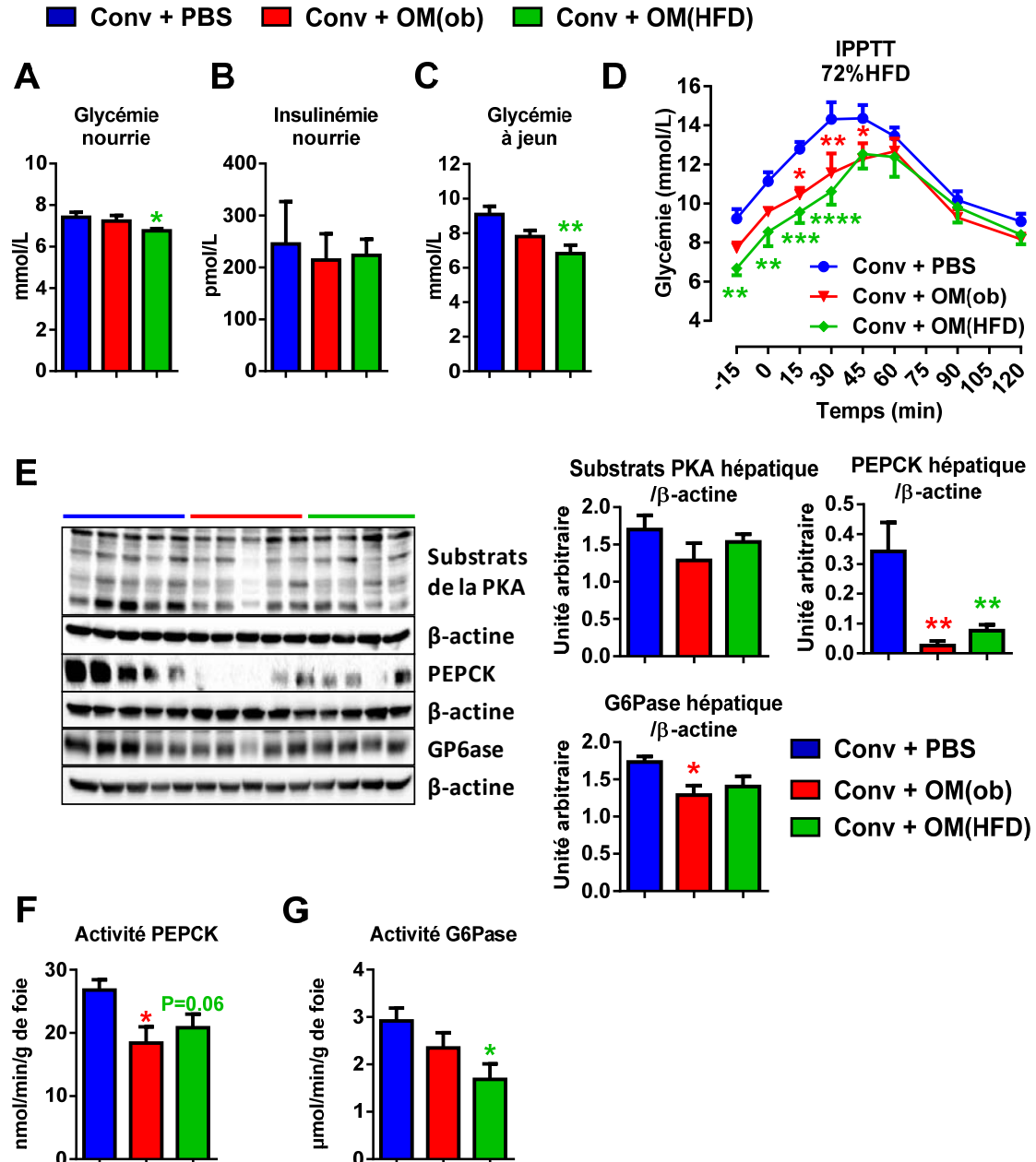


Figure 44: Analyses du métabolisme hépatique des souris receveuses Conv + OM(HFD) et Conv + OM(ob) après 6 semaines de régime hyperlipidique.

Deux groupes de 6 souris mâles ont reçu par gavage le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques ob/ob nourries avec un régime normal (groupe Conv + OM(ob) en rouge) ou le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques nourries avec un régime hyperlipidique (groupe Conv + OM(HFD) en vert). Le groupe de 5 souris contrôles a reçu du PBS anaérobie par gavage (groupe Conv + PBS en bleu). Trois semaines après le deuxième gavage, les souris receveuses ont été nourries avec un régime hyperlipidique pendant 6 semaines (72% HFD). (A) Glycémie mesurée en condition nourrie. (B) Insuline plasmatique en condition nourrie. (C) Glycémie après 6 heures de jeûne. (D) Test de tolérance au pyruvate effectué après 6 heures de jeûne. (E) Quantifications par western blot des protéines phosphorylées par la PKA, de la PEPCK et de la G6Pase après 6 heures de jeûne. Les histogrammes représentent la quantification des protéines normalisées sur la β -actine. Activités de (F) la PEPCK et de (G) la G6Pase mesurées après 6 heures de jeûne. Les résultats ont été exprimés en valeurs moyennes \pm l'écart standard à la moyenne (S.E.M). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (A-C-E-F-G) one-way ANOVA avec un post-test de Dunnett les groupes traités ont été comparés au groupe Conv + PBS (D) two-way ANOVA avec un post-test de Dunnett les groupes traités ont été comparés au groupe Conv + PBS.

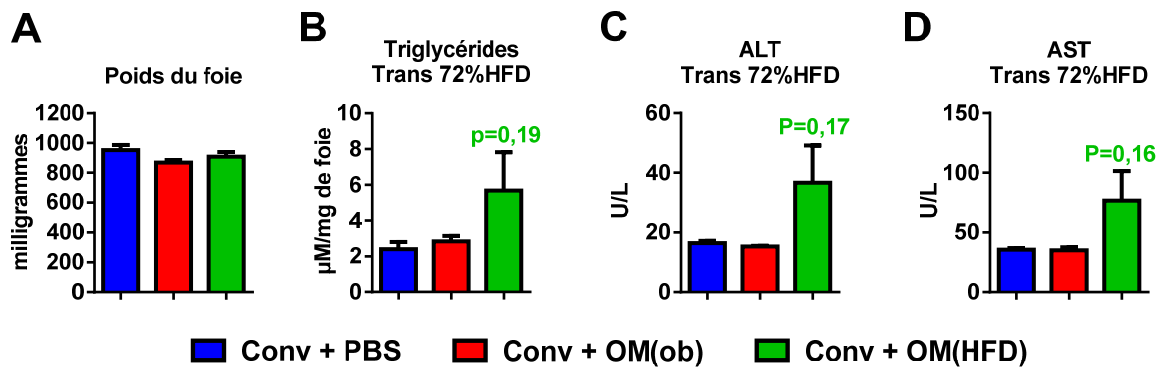


Figure 45: Analyses du profil hépatique des souris receveuses nourries avec un régime hyperlipidique.

Deux groupes de 6 souris mâles ont reçu par gavage le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques ob/ob nourries avec un régime normal (groupe Conv + OM(ob) en rouge) ou le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques nourries avec un régime hyperlipidique (groupe Conv + OM(HFD) en vert). Le groupe de 5 souris contrôles a reçu du PBS anaérobie par gavage (groupe Conv + PBS en bleu). Trois semaines après le deuxième gavage, les souris receveuses ont été nourries avec un régime hyperlipidique pendant 6 semaines (72% HFD). (A) Poids du foie. (B) Contenu hépatique en triglycérides. Dosage plasmatique des transaminases (C) ALanine aminoTransférase (ALT) et (D) ASpartate aminoTransférase (AST). Les résultats ont été exprimés en valeurs moyennes \pm l'écart standard à la moyenne (S.E.M). Les statistiques ont été mesurées par un test T de Student en comparant le groupe Conv + OM(HFD) au groupe Conv + PBS.

V- Impact du transfert de microbiote OM(HFD) et OM(ob) sur le tissu adipeux viscéral des souris receveuses nourries avec un régime hyperlipidique

Après avoir nourri avec un régime hyperlipidique les 3 groupes de souris transplantées nous n'avons pas constaté de variations significatives du poids corporel (**Fig. 46, A**). Néanmoins, nous avons mesuré un taux de masse grasse légèrement plus faible chez les souris Conv + OM(HFD) comparativement au groupe contrôle pour une masse maigre inchangée (**Fig. 46, B-C**). L'analyse histologique du tissu adipeux a révélé que la taille moyenne des adipocytes était plus faible dans le groupe Conv+ OM(HFD) comparativement au groupe Conv+ PBS (**Fig. 46, D**). Par opposition, le transfert du microbiote OM(ob) n'a pas induit de modifications significatives du tissu adipeux. De plus, les souris du groupe Conv + OM(HFD) ont significativement plus d'acides gras libres dans le sang comparativement aux souris Conv + PBS (**Fig. 46, E**). L'ensemble de ces données a été mesuré à jeun et laisse penser que la lipolyse est augmentée chez les souris Conv + OM(HFD). Par ailleurs, les taux de triglycérides, de cholestérol, de HDL et de LDL ne sont pas significativement différents entre les 3 groupes de souris (**Fig. 46, F-I**).

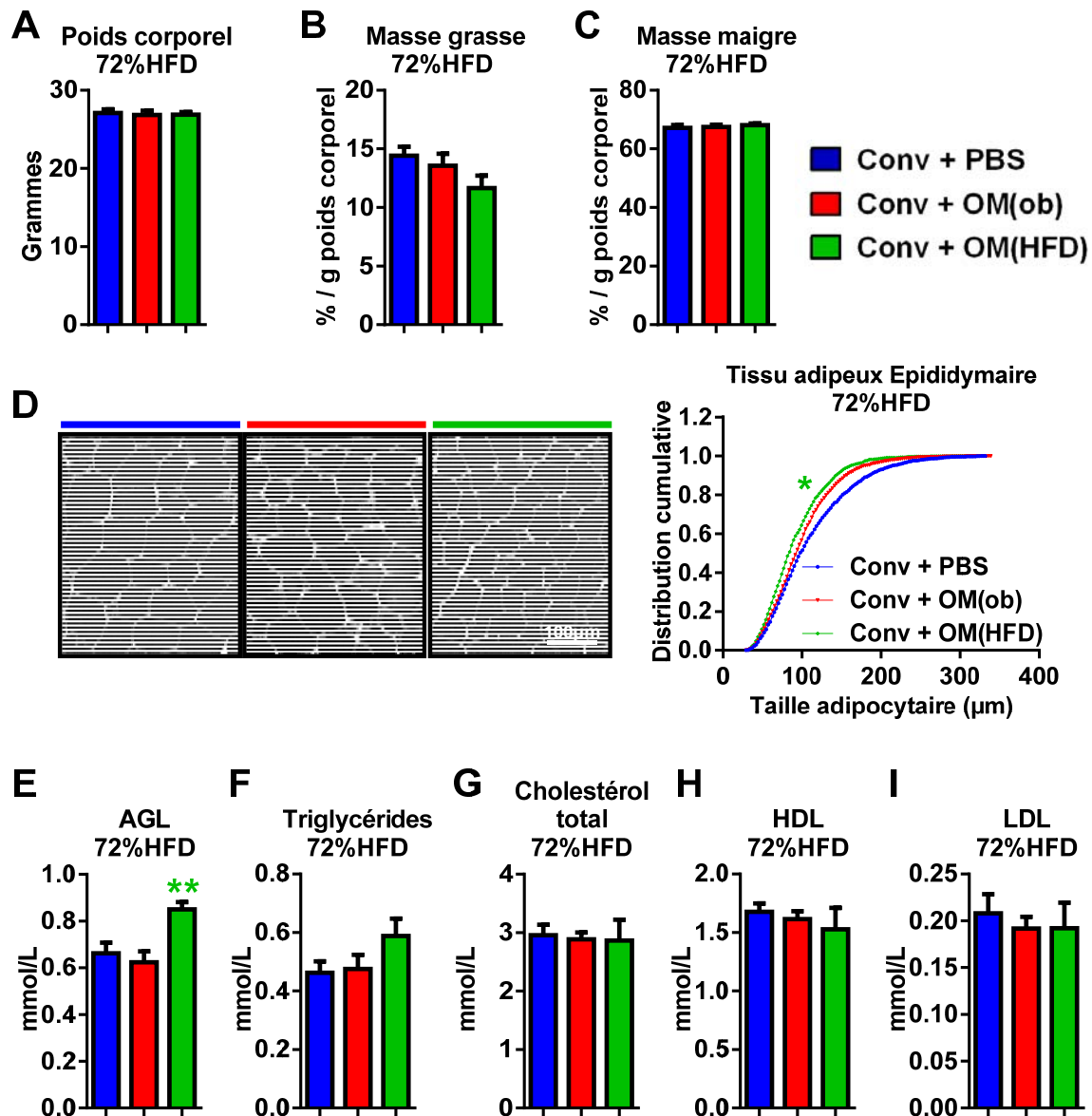


Figure 46: Analyses du tissu adipeux et bilan lipidique des souris receveuses nourries avec un régime hyperlipidique.

Deux groupes de 6 souris mâles ont reçu par gavage le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques ob/ob nourries avec un régime normal (groupe Conv + OM(ob) en rouge) ou le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques nourries avec un régime hyperlipidique (groupe Conv + OM(HFD) en vert). Le groupe de 5 souris contrôles a reçu du PBS anaérobie par gavage (groupe Conv + PBS en bleu). Trois semaines après le deuxième gavage, les souris receveuses ont été nourries avec un régime hyperlipidique pendant 6 semaines (72% HFD). (A) Poids corporel. Pourcentages de (B) masse grasse et de (C) masse maigre. (D) Histologie du tissu adipeux épидидymaire et mesure de la taille des adipocytes représentée en distribution cumulative. Dosages plasmatiques après 6 heures de jeûne (E) des AGL (Acides Gras Libres (F) des triglycérides (G) du cholestérol total (H) des HDL (lipoprotéines à haute densité) et (I) des LDL (lipoprotéines à faible densité). Les résultats ont été exprimés en valeurs moyennes \pm l'écart standard à la moyenne (S.E.M). * $p < 0.05$, (D) two-way ANOVA et post-test de Sidak, les groupes traités ont été comparés au groupe Conv + PBS et (E) ** $p < 0.01$, test T de Student en comparant le groupe Conv + OM(HFD) au groupe Conv + PBS.

VI- Impact du transfert de microbiote OM(HFD) et OM(ob) sur l'inflammation et la perméabilité iléale des souris receveuses nourries avec un régime hyperlipidique

Lors du premier protocole nous n'avions pas détecté de modifications majeures sur la perméabilité iléale et l'inflammation des souris transplantées lorsque celle-ci étaient nourries sous régime normal (**Fig. 31**). Néanmoins, nous avons récemment montré dans notre laboratoire que la consommation d'un régime hyperlipidique dépourvue de glucose (HFD 72%) entraîne une baisse du tonus inflammatoire iléal conduisant au développement des maladies métaboliques²¹⁴. Nous avons donc mesuré le tonus inflammatoire iléal des 3 groupes de souris transplantées nourries avec un régime hyperlipidique. Nous avons constaté une augmentation significative de l'expression de iNOS, INF- γ et d'IL-6 dans l'iléon des souris ayant reçu le microbiote OM(HFD) comparativement aux souris contrôles (**Fig. 47, A**). Cette augmentation significative est également associée une tendance à l'augmentation de l'expression INF- γ et a une diminution de l'expression de FoxP3 dans les nœuds lymphatiques mésentériques des souris Conv + OM(HFD) (**Fig. 47, B**). Par ailleurs, l'expression des marqueurs inflammatoires mesurés chez les souris Conv + OM(ob) n'est significativement différente du groupe Conv + PBS. Enfin, l'expression des protéines des jonctions serrées n'a pas été modifiée entre les 3 groupes de souris (**Fig. 47, C**).

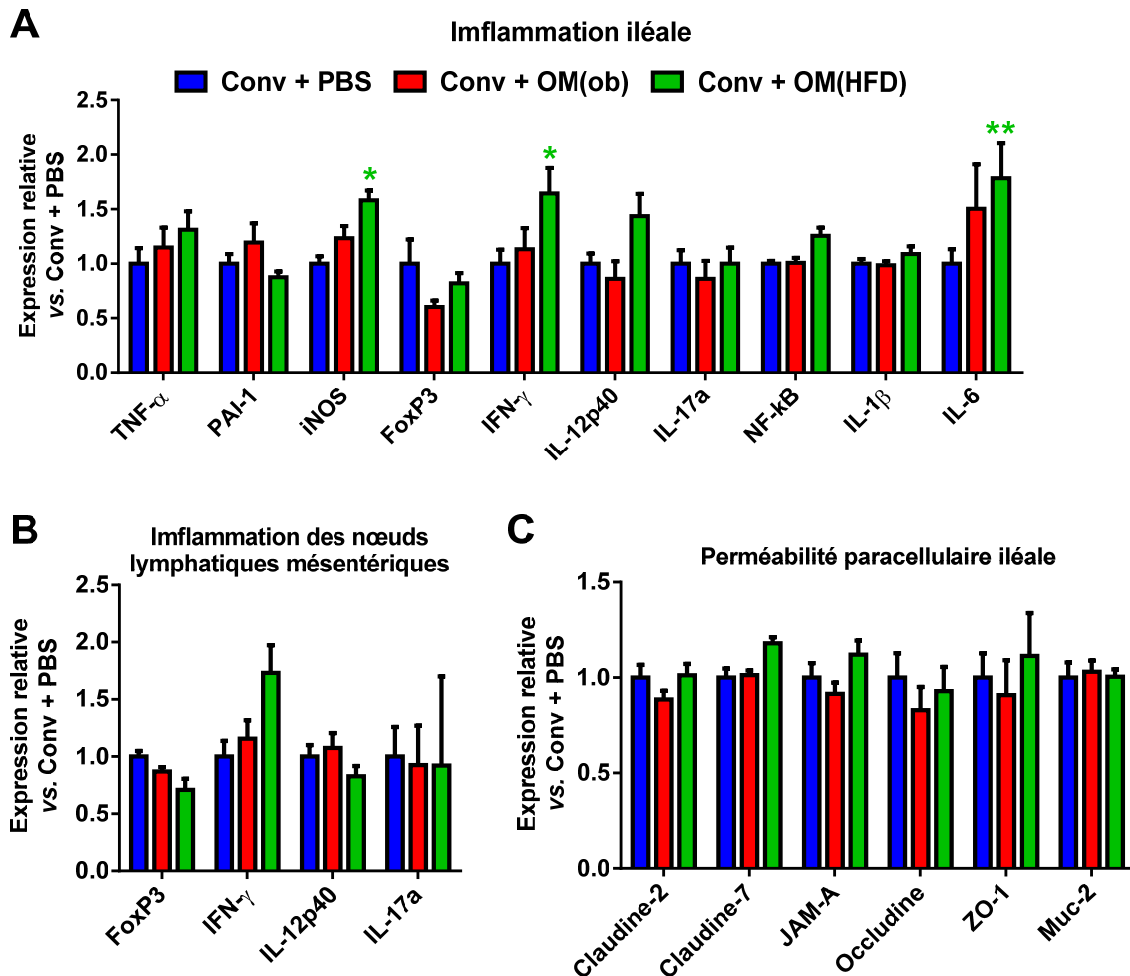


Figure 47: Inflammation et perméabilité iléale chez les souris receveuses Conv + OM(HFD) et Conv + OM(ob) nourries avec un régime hyperlipidique.

Deux groupes de 6 souris mâles ont reçu par gavage le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques ob/ob nourries avec un régime normal (groupe Conv + OM(ob) en rouge) ou le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques nourries avec un régime hyperlipidique (groupe Conv + OM(HFD) en vert). Le groupe contrôle de 5 souris a reçu du PBS anaérobie par gavage (groupe Conv + PBS en bleu). Trois semaines après le deuxième gavage, les souris receveuses ont été nourries avec un régime hyperlipidique pendant 6 semaines (72% HFD). (A) Expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire dans l'iléon (TNF- α pour Tumor Necrosis Factor- α , PAI-1 pour Plasminogen Activator Inhibitor-1, iNOS pour inducible Nitric Oxyde Synthase, Foxp3 pour Forkhead box P3, IFN- γ pour InterFéroN- γ , IL-12p40 pour InterLeukine-12p40, IL-17a pour InterLeukine-17a, NF- κ B pour Nuclear Factor- κ B, IL-1 β pour InterLeukine-1 β et IL-6 pour InterLeukine-6). (B) Expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire dans les nœuds lymphatiques mésentériques (Foxp3 pour Forkhead box P3, IFN- γ pour InterFéroN- γ , IL-12p40 pour InterLeukine-12p40 et IL-17a pour InterLeukine-17a). (C) Expression des gènes codant pour les jonctions serrées (JAM-A pour Junctional Adhesion Molecule-A et ZO-1 pour Zonula Occludens-1). Les résultats ont été exprimés en valeurs moyennes \pm l'écart standard à la moyenne (S.E.M). (n=3 pour la figure B et n=5-6 pour les autres figures) *p<0.05, **p<0.01 au test two-way ANOVA avec un post-test de Dunnett. Les groupes traités ont été comparés au groupe Conv + PBS.

VII- Analyses taxonomiques et fonctionnelles du microbiote des souris receveuses OM(ob) et OM(HFD)

Lors du deuxième protocole de transfert caecal, nous avons effectué les mêmes analyses du microbiote intestinal que lors du premier protocole. Quel que soit le groupe de souris l'analyse en coordonnées principales révèle des différences entre le microbiote des souris avant et après le transfert caecal (**Fig. 48, A-C**). Comme lors du premier protocole, nous avons constaté des modifications taxonomiques du microbiote intestinal au cours du temps chez le groupe Conv + PBS (**Fig. 48, A et D**). Par ailleurs, le transfert du microbiote OM(HFD) a entraîné des variations du microbiote intestinal des souris receveuses significativement plus importantes que les variations observées dans le groupe Conv + PBS (**Fig. 48, D**). Cependant, de manière inattendue, les variations du microbiote intestinal entre la condition basale et Trans NC des souris Conv + OM(ob) ont été significativement moins importantes que chez les souris Conv + PBS (**Fig. 48, D**).

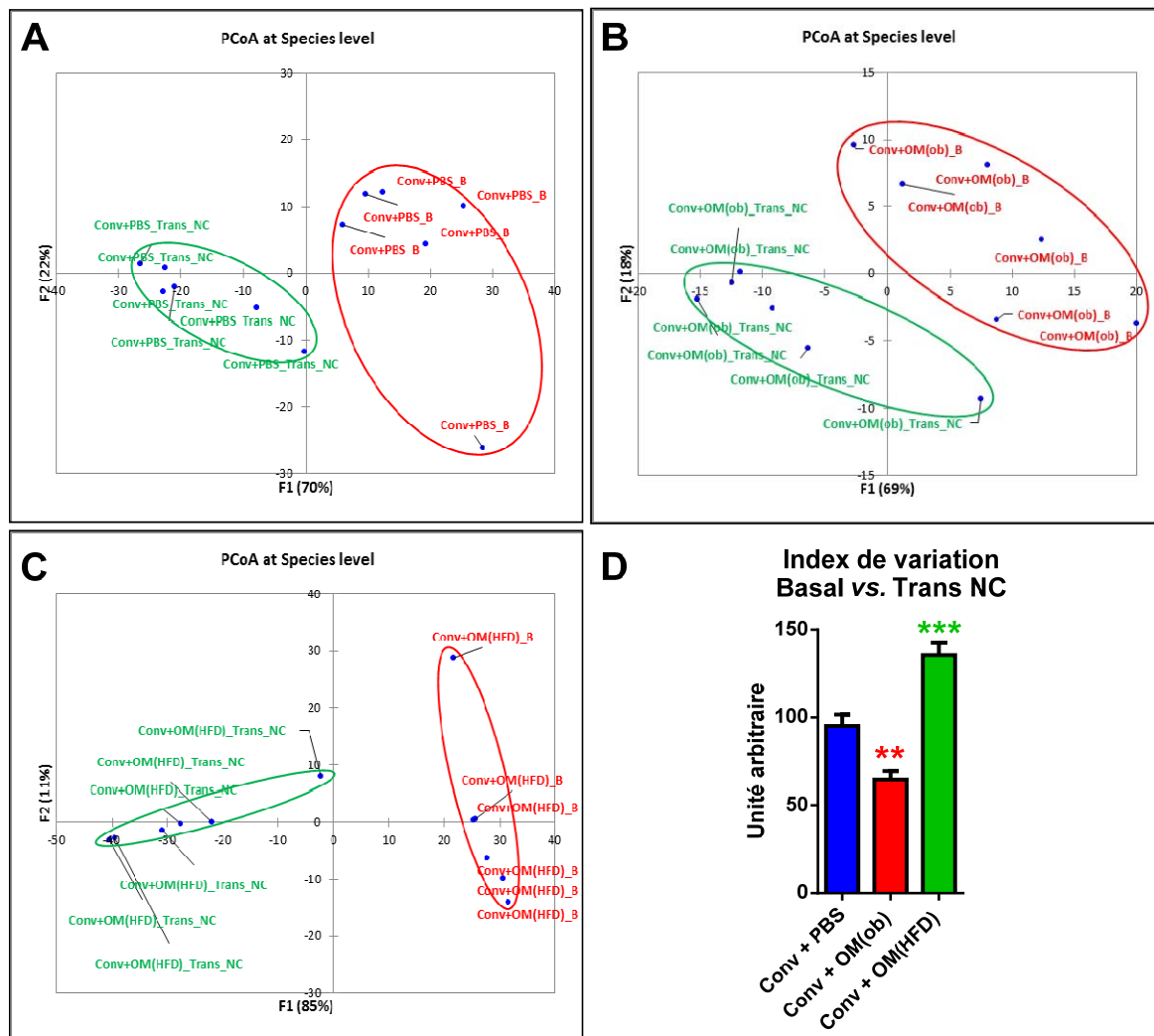


Figure 48: Analyses des modifications du microbiote fécal prélevé avant et après le transfert de microbiote pour les 3 groupes de souris Conv + PBS, Conv + OM(ob) et Conv + OM(HFD) lors du protocole #2.

Deux groupes de 6 souris mâles ont reçu par gavage le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques ob/ob nourries avec un régime normal (groupe Conv + OM(ob)) ou le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques nourries avec un régime hyperlipidique (groupe Conv + OM(HFD)). Le groupe de 6 souris contrôles a reçu du PBS anaérobie par gavage (groupe Conv + PBS). L'ensemble des résultats présentés sur la figure a été généré à partir des données obtenues par le pyroséquençage du microbiote fécal prélevé en condition basale (avant le transfert caecal) et Trans NC (3 semaines après le transfert caecal). (A) Analyse en coordonnées principales (PCoA) du profil du microbiote intestinal des souris Conv + PBS avant et après le transfert de microbiote. L'analyse en coordonnées principales permet d'apprécier ici la distribution spatiale des différentes souris sur un graphique à 2 dimensions. Chaque point de couleur rouge ou vert représente une souris. Chaque souris apparaît 2 fois sur le graphique (un point rouge pour la condition basale (B) et un point vert pour la condition 3 semaines après le transfert caecal (Trans NC). Plus les souris sont éloignées l'une de l'autre sur le graphique moins leur microbiote présente des similitudes. Le logiciel ne tient pas compte du groupe d'appartenance de la souris pour faire l'analyse, les couleurs et les cercles sont positionnés après l'analyse. (B) Analyse en coordonnées principales (PCoA) du profil du microbiote intestinal des souris Conv + OM(ob) avant et après le transfert de microbiote. (C) Analyse en coordonnées principales (PCoA) du profil du microbiote intestinal des souris Conv + OM(HFD) avant et après le transfert de microbiote. (D) Index relatif quantifiant le degré de variabilité du microbiote intestinal entre la condition basale et Trans NC pour les 3 groupes de souris. Les résultats ont été exprimés en valeurs moyennes \pm l'écart standard à la moyenne (S.E.M). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ au test one-way ANOVA avec un post-test de Dunnett. Les groupes traités ont été comparés au groupe Conv + PBS.

La variabilité observée entre le microbiote basal et Trans NC pour les 3 groupes de souris est matérialisée par des différences significatives dans la proportion relative de plusieurs groupes bactériens (**Fig. 49-51**). Parmi ces groupes, comme lors du **protocole #1**, nous avons observé une augmentation significative du genre bactérien *Allobaculum* chez les souris Conv + OM(HFD) (**Fig. 51, a5**).

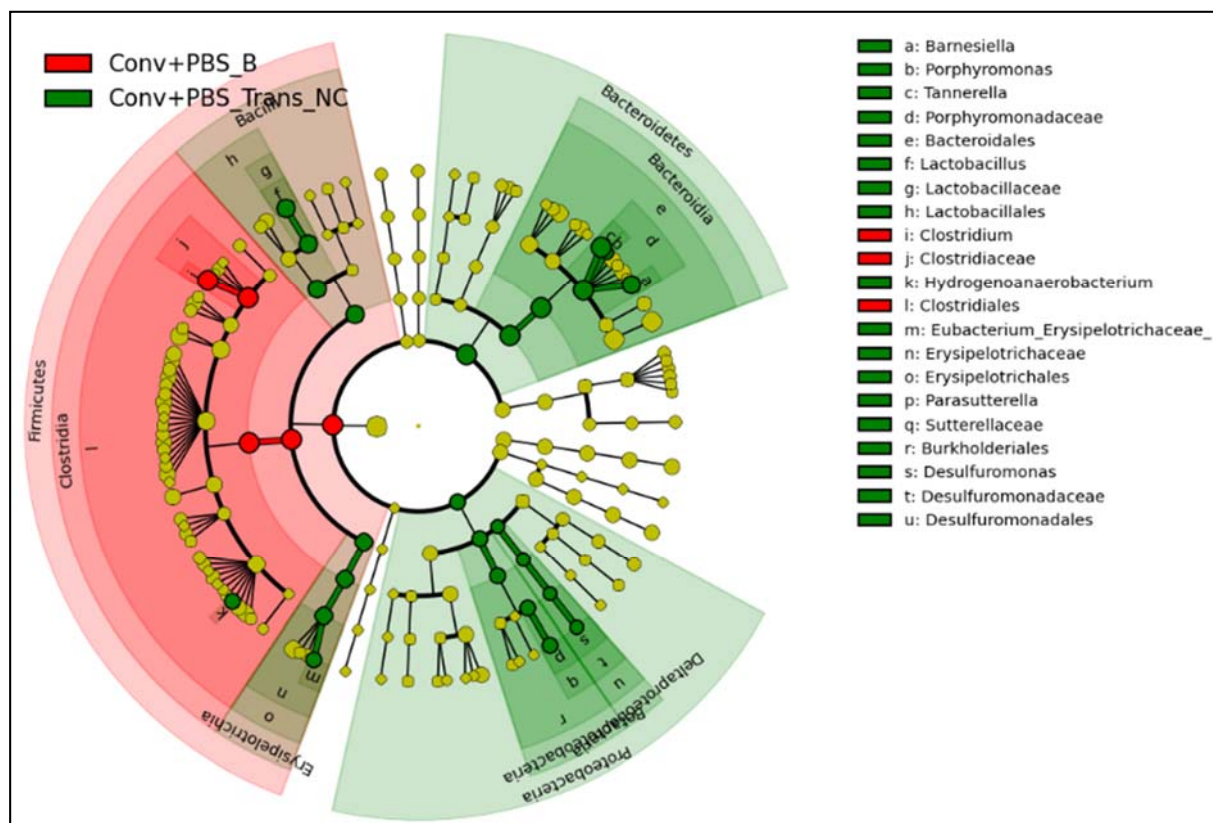


Figure 49: Comparaison du microbiote des souris Conv + PBS en condition basale et Trans NC lors du protocole #2.

La représentation en Cladogramme a été générée à partir des données obtenues par pyroséquençage sur le logiciel LEfSe. Le rond jaune au centre du graphique représente le règne des bactéries. Ensuite ce graphique est constitué de 5 cercles excentriques successifs sur lesquels sont disposés des ronds. Chaque cercle représente un niveau de classification taxonomique (du centre vers l'extrémité : phylum, classe, ordre, famille et genre) et chaque rond représente soit un phylum, une classe, un ordre, une famille ou un genre différente en fonction du cercle sur lequel il se trouve. Par exemple, chaque rond disposé sur le cercle des phyla représente un phylum différent. Les ronds surlignés en vert correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée en condition Trans NC comparativement à la condition basale (B). Les ronds surlignés en rouge correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée en condition basale comparativement à la condition Trans NC. Les prélèvements en condition basale et Trans NC ont été effectués chez les mêmes souris du groupe Conv + PBS (n=6).

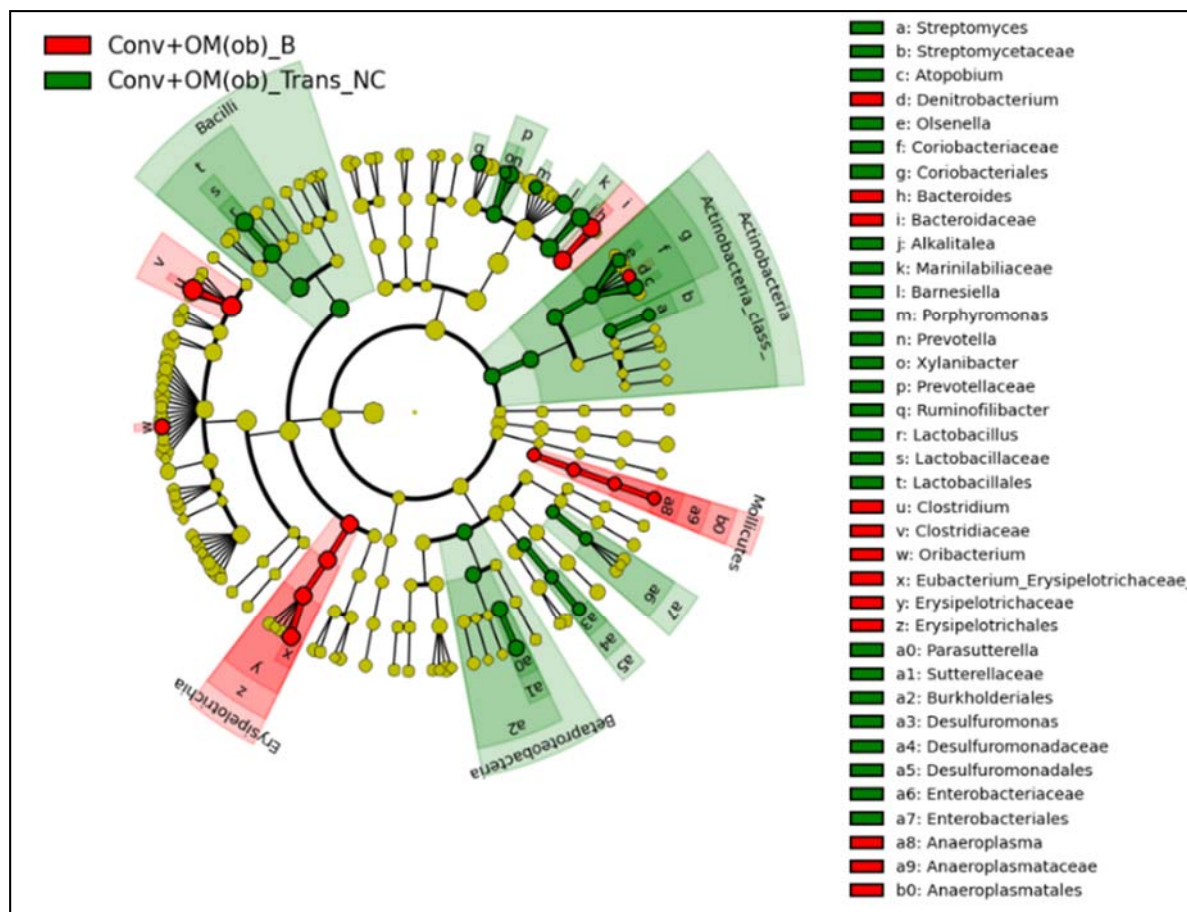


Figure 50: Comparaison du microbiote des souris Conv + OM(ob) en condition basale et Trans NC lors du protocole #2.

La représentation en Cladogramme a été générée à partir des données obtenues par pyroséquençage sur le logiciel LEfSe. Le rond jaune au centre du graphique représente le règne des bactéries. Ensuite ce graphique est constitué de 5 cercles excentriques successifs sur lesquels sont disposés des ronds. Chaque cercle représente un niveau de classification taxonomique (du centre vers l'extrémité : phylum, classe, ordre, famille et genre) et chaque rond représente soit un phylum, une classe, un ordre, une famille ou un genre différente en fonction du cercle sur lequel il se trouve. Par exemple, chaque rond disposé sur le cercle des phyla représente un phylum différent. Les ronds surlignés en vert correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée en condition Trans NC comparativement à la condition basale (B). Les ronds surlignés en rouge correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée en condition basale comparativement à la condition Trans NC. Les prélèvements en condition basale et Trans NC ont été effectués chez les mêmes souris du groupe Conv + OM(ob) (n=6).

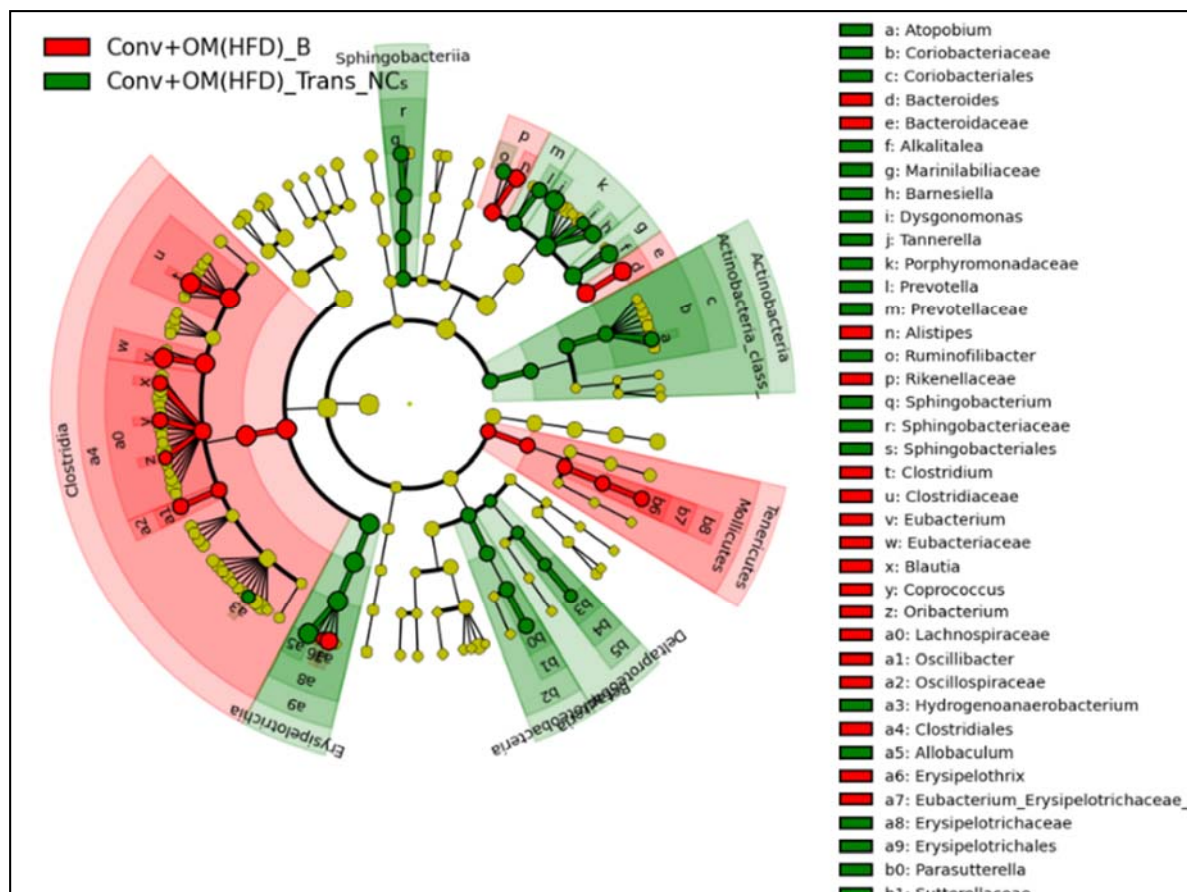


Figure: 51: Comparaison du microbiote des souris Conv + OM(HFD) en condition basale et Trans NC lors du protocole #2.

La représentation en Cladogramme a été générée à partir des données obtenues par pyroséquençage sur le logiciel LEfSe. Le rond jaune au centre du graphique représente le règne des bactéries. Ensuite ce graphique est constitué de 5 cercles excentriques successifs sur lesquels sont disposés des ronds. Chaque cercle représente un niveau de classification taxonomique (du centre vers l'extrémité : phylum, classe, ordre, famille et genre) et chaque rond représente soit un phylum, une classe, un ordre, une famille ou un genre différent en fonction du cercle sur lequel il se trouve. Par exemple, chaque rond disposé sur le cercle des phyla représente un phylum différent. Les ronds surlignés en vert correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée en condition Trans NC comparativement à la condition basale (B). Les ronds surlignés en rouge correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée en condition basale comparativement à la condition Trans NC. Les prélèvements en condition basale et Trans NC ont été effectués chez les mêmes souris du groupe Conv + OM(HFD) (n=6).

D'un point de vue fonctionnel, l'analyse PICRUST du microbiote intestinal a permis de mettre en évidence 3 fonctions significativement modifiées entre les conditions basale et Trans NC pour le groupes Conv + PBS, une fonction significativement modifiée dans le groupe Conv + OM(ob) et 10 fonctions significativement modifiées dans le groupe Conv + OM(HFD) (Fig. 52, A-C). Ces résultats mettent en évidence des modifications du microbiote intestinal plus importantes lors du transfert du microbiote issu de souris OM(HFD) comparativement aux 2 groupes de souris transplantées.

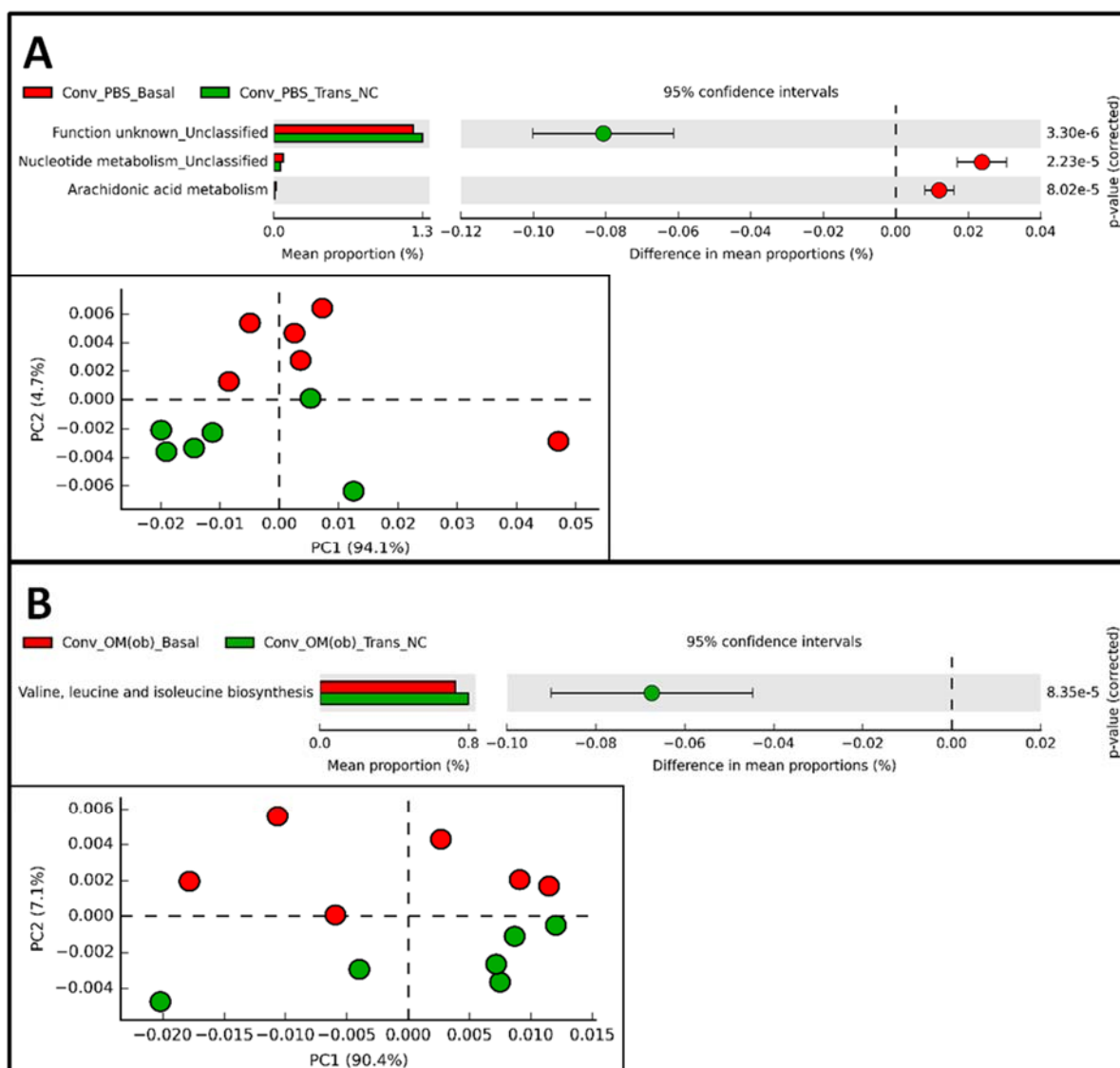


Figure 52 (A et B): Analyses prédictives des fonctions microbiennes significativement modifiées entre avant et après le transfert de microbiote chez les groupes de souris Conv + PBS et Conv + OM(ob) lors du protocole #2.

Deux groupes de 6 souris mâles ont reçu par gavage le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques ob/ob nourries avec un régime normal (groupe Conv + OM(ob)) ou le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques nourries avec un régime hyperlipidique (groupe Conv + OM(HFD)). Le groupe de 6 souris contrôles a reçu du PBS anaérobie par gavage (groupe Conv + PBS en bleu). L'ensemble des résultats présentés sur la figure a été généré à partir des données obtenues par le pyroséquençage du microbiote fécal prélevé en condition basale (avant le transfert caecal) et Trans NC (3 semaines après le transfert caecal). Une analyse prédictive des fonctions bactériennes potentiellement modifiées entre la condition basale (avant le transfert caecal) et Trans NC (après le transfert caecal) a été effectuée par le logiciel PICRUSt. **(A)** Fonctions bactériennes significativement modulées chez le groupe Conv + PBS et représentation en analyse en composantes principales (PCA) de la distribution des souris dans l'espace, en fonction des modifications des voies métaboliques bactériennes obtenues par PICRUSt. **(B)** Représentations similaires des données PICRUSt pour le groupe Conv + OM(ob).

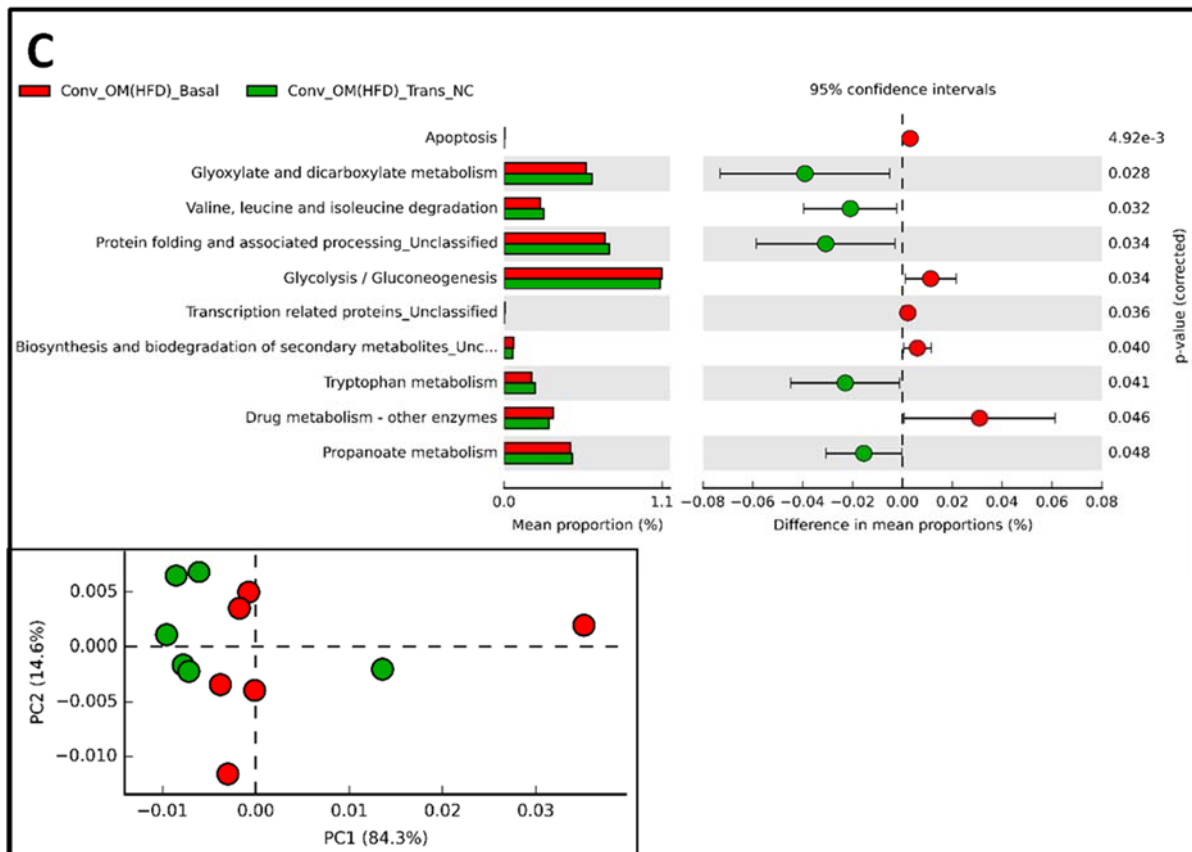


Figure 52 (C): Analyses prédictives des fonctions microbiennes significativement modifiées entre avant et après le transfert de microbiote chez le groupe Conv + OM(HFD) lors du protocole #2.

(C) Fonctions bactériennes significativement modulées chez le groupe Conv + OM(HFD) entre des conditions basale et Trans NC et représentation en analyse en composantes principales (PCA) de la distribution des souris dans l'espace en fonction des modifications des voies métaboliques bactériennes obtenues par PICRUST.

En comparant les microbiotes des 3 groupes de souris transplantées entre eux nous avons constaté des différences taxonomiques significatives avant le transfert de microbiote (comme lors du premier protocole) (**Fig. 53**). Après le transfert, l'analyse en coordonnées principales des microbiotes intestinaux met en lumière une séparation des souris Conv + OM(HFD) des 2 autres groupes de souris en suivant l'axe de la première coordonnée principale (Axe Horizontal) (**Fig. 54**). Ces résultats suggèrent que les souris Conv + OM(HFD) ont un microbiote différent des 2 autres groupes Conv + PBS et Conv + OM(ob). Après 6 semaines de régime hyperlipidique, l'analyse en coordonnées principales suggère que le microbiote des 3 groupes de souris s'est homogénéisé (**Fig. 55, A**). Ces résultats ne sont pas surprenants au vue de l'effet majeur du régime sur la composition du microbiote intestinal. Néanmoins, malgré le régime, plusieurs groupes de bactéries restent significativement modifiés entre les 3 groupes de souris, ce qui suggère que le régime hyperlipidique n'a pas complètement nivelé les différences entre les différents microbiotes (**Fig. 55, B**).

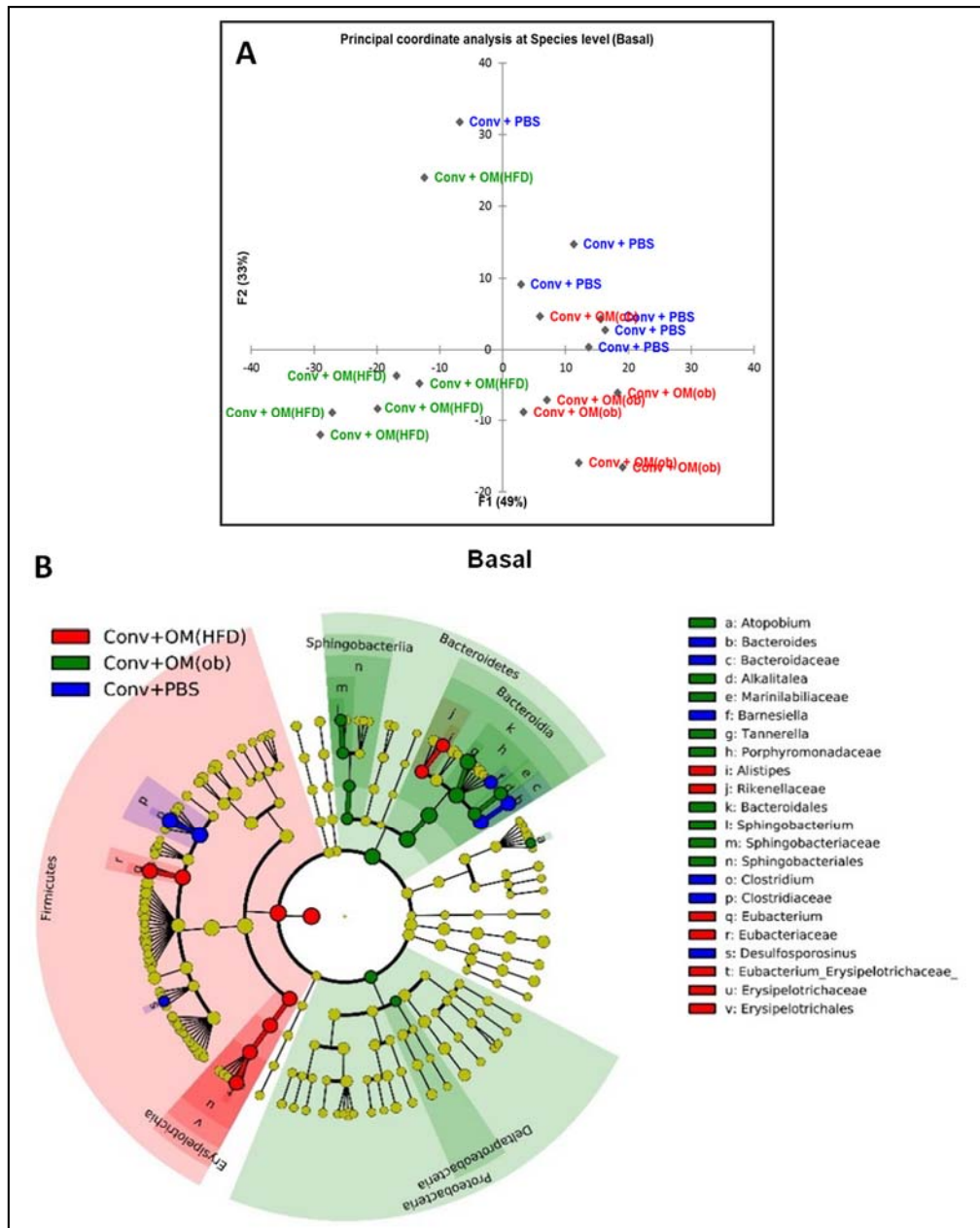


Figure 53: Analyse des différences présentes avant le transfert de microbiote (condition basale) entre le microbiote des 3 groupes de souris Conv + PBS, Conv + OM(ob) et Conv + OM(HFD) lors du protocole #2.

L'ensemble des résultats présentés sur la figure a été généré à partir des données obtenues par le pyroséquençage du microbiote fécal prélevé en condition basale (avant le transfert caecal). (A) Analyse en coordonnées principales (PCoA) du profil du microbiote intestinal des 3 groupes de souris (Conv + PBS, Conv + OM(ob) et Conv + OM(HFD)). (B) Représentation en Cladogramme générée à partir des données obtenues par pyroséquençage sur le logiciel LEfSe. Le rond jaune au centre du graphique représente le règne des bactéries. Ensuite ce graphique est constitué de 5 cercles excentriques successifs sur lesquels sont disposés des ronds. Chaque cercle représente un niveau de classification taxonomique (du centre vers l'extrémité : phylum, classe, ordre, famille et genre) et chaque rond représente soit un phylum, une classe, un ordre, une famille ou un genre différent en fonction du cercle sur lequel il se trouve. Par exemple, chaque rond disposé sur le cercle des phyla représente un phylum différent. Les ronds surlignés en rouge correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée dans le groupe Conv + OM(HFD) comparativement aux 2 autres groupes Conv + PBS et Conv + OM(ob). Les ronds surlignés en vert correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée dans le groupe Conv + OM(ob) comparativement aux 2 autres groupes Conv + PBS et Conv + OM(HFD). Les ronds surlignés en bleu correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée dans le groupe Conv + PBS comparativement aux 2 autres groupes Conv + OM(ob) et Conv + OM(HFD). (n=6 souris par groupe).

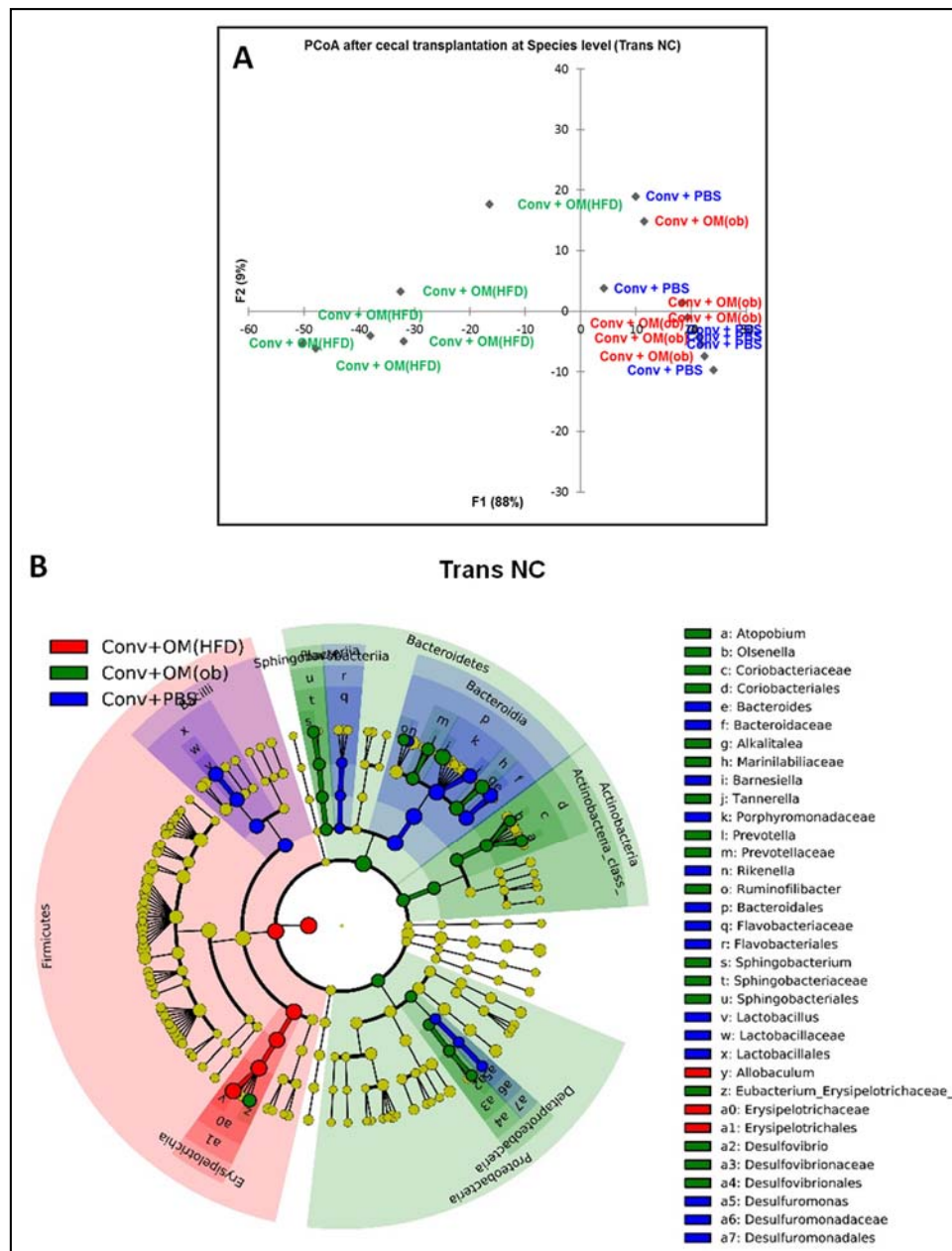


Figure 54: Analyse des différences présentes après le transfert de microbiote (condition Trans NC) entre le microbiote des 3 groupes de souris Conv + PBS, Conv + OM(ob) et Conv + OM(HFD) lors du protocole #2.

L'ensemble des résultats présentés sur la figure a été généré à partir des données obtenues par le pyroséquençage du microbiote fécal prélevé 3 semaines après le transfert caecal (Trans NC). (A) Analyse en coordonnées principales (PCoA) du profil du microbiote intestinal des 3 groupes de souris (Conv + PBS, Conv + OM(ob) et Conv + OM(HFD)). (B) Représentation en Cladogramme générée à partir des données obtenues par pyroséquençage sur le logiciel LEfSe. Le rond jaune au centre du graphique représente le règne des bactéries. Ensuite ce graphique est constitué de 5 cercles excentriques successifs sur lesquels sont disposés des ronds. Chaque cercle représente un niveau de classification taxonomique (du centre vers l'extrémité : phylum, classe, ordre, famille et genre) et chaque rond représente soit un phylum, une classe, un ordre, une famille ou un genre différent en fonction du cercle sur lequel il se trouve. Par exemple, chaque rond disposé sur le cercle des phyla représente un phylum différent. Les ronds surlignés en rouge correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée dans le groupe Conv + OM(HFD) comparativement aux 2 autres groupes Conv + PBS et Conv + OM(ob). Les ronds surlignés en vert correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée dans le groupe Conv + OM(ob) comparativement aux 2 autres groupes Conv + PBS et Conv + OM(HFD). Les ronds surlignés en bleu correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée dans le groupe Conv + PBS comparativement aux 2 autres groupes Conv + OM(ob) et Conv + OM(HFD). (n=6 souris par groupe).

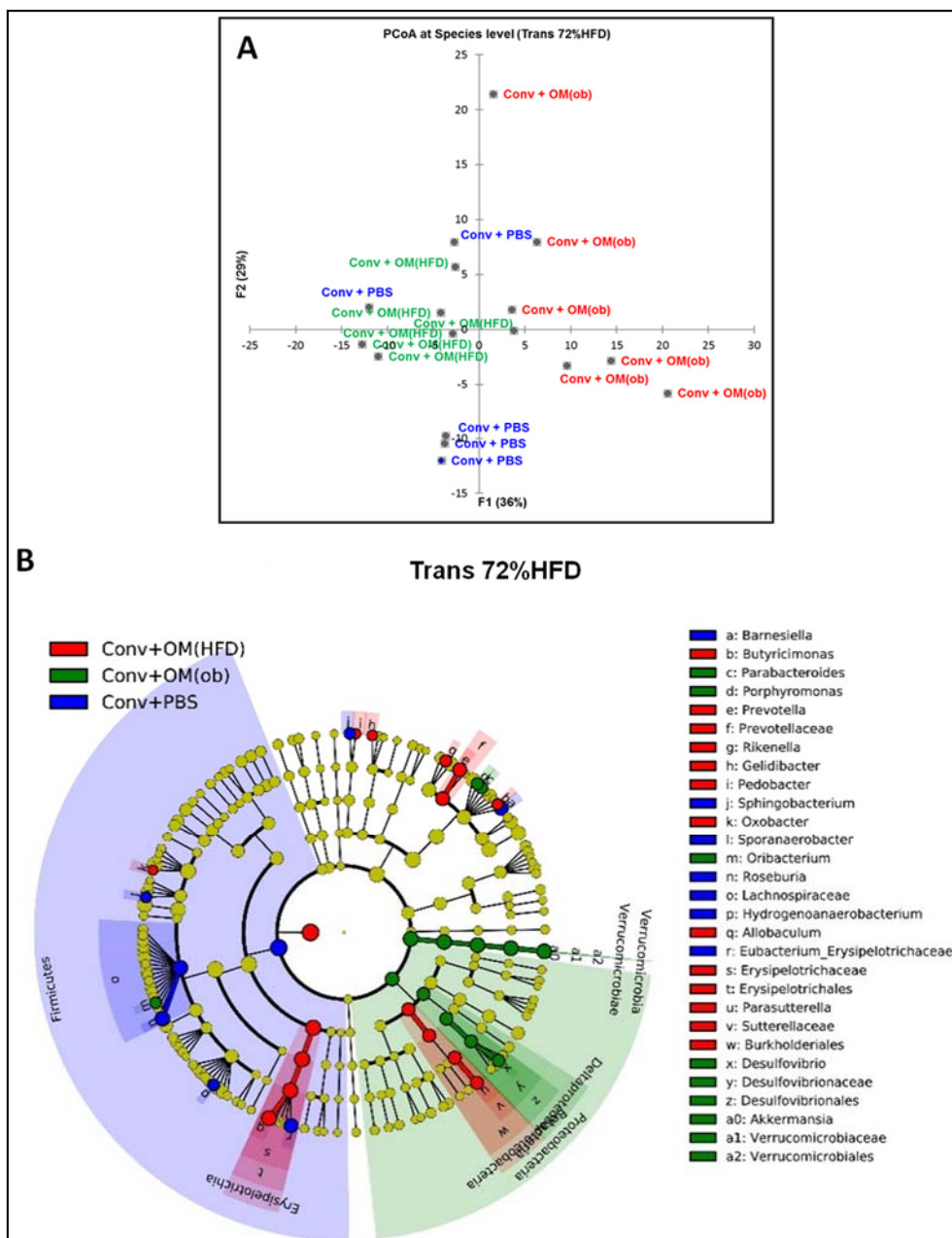


Figure 55: Analyse des différences présentes après le régime hyperlipidique (condition Trans 72%HFD) entre le microbiote des 3 groupes de souris Conv + PBS, Conv + OM(ob) et Conv + OM(HFD) lors du protocole #2.

L'ensemble des résultats présentés sur la figure a été généré à partir des données obtenues par le pyroséquençage du microbiote fécal prélevé après 6 semaines de régime hyperlipidique (condition Trans 72%HFD). **(A)** Analyse en coordonnées principales (PCoA) du profil du microbiote intestinal des 3 groupes de souris (Conv + PBS, Conv + OM(ob) et Conv + OM(HFD)). **(B)** Représentation en Cladogramme générée à partir des données obtenues par pyroséquençage sur le logiciel LEfSe. Le rond jaune au centre du graphique représente le règne des bactéries. Ensuite ce graphique est constitué de 5 cercles excentriques successifs sur lesquels sont disposés des ronds. Chaque cercle représente un niveau de classification taxonomique (du centre vers l'extrémité : phylum, classe, ordre, famille et genre) et chaque rond représente soit un phylum, une classe, un ordre, une famille ou un genre différent en fonction du cercle sur lequel il se trouve. Par exemple, chaque rond disposé sur le cercle des phyla représente un phylum différent. Les ronds surlignés en rouge correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée dans le groupe Conv + OM(HFD) comparativement aux 2 autres groupes Conv + PBS et Conv + OM(ob). Les ronds surlignés en vert correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée dans le groupe Conv + OM(ob) comparativement aux 2 autres groupes Conv + PBS et Conv + OM(HFD). Les ronds surlignés en bleu correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée dans le groupe Conv + PBS comparativement aux 2 autres groupes Conv + OM(ob) et Conv + OM(HFD). (n=6 souris par groupe).

Les différences taxonomiques observées entre les groupes de souris avant le transfert caecal (**Fig. 53**) ne sont pas associées à des différences majeures de fonctions. En effet, l'analyse en composantes principales des voies métaboliques bactériennes générées par l'analyse PICRUSt ne permet pas de distinguer plusieurs groupes de souris (**Fig. 56, A**). Seule une souris du groupe Conv + PBS et une souris de groupe Conv + OM(HFD) se distingue des autres souris (**Fig. 56, A**). Malgré cette absence de variation générale, certaines voies métaboliques sont significativement modifiées entre les différents groupes (**Fig. 56, B et C**). Cependant, après le transfert de microbiote, 2 groupes de souris se distinguent lors de l'analyse en composantes principales (**Fig. 56, D**). En effet, les 6 souris ayant reçu le microbiote OM(HFD) se séparent nettement des 12 autres souris Conv + PBS et Conv + OM(ob). De plus, en analysant séparément chaque fonction bactérienne, seules les souris Conv + OM(HFD) possèdent des fonctions bactériennes significativement différentes des 2 autres groupes de souris. Parmi ces voies modifiées, on constate une augmentation significative du métabolisme du glyoxylate et du cycle de Krebs dans le microbiote des souris Conv + OM(HFD) comparativement aux souris Conv + PBS (**Fig. 56, E**).

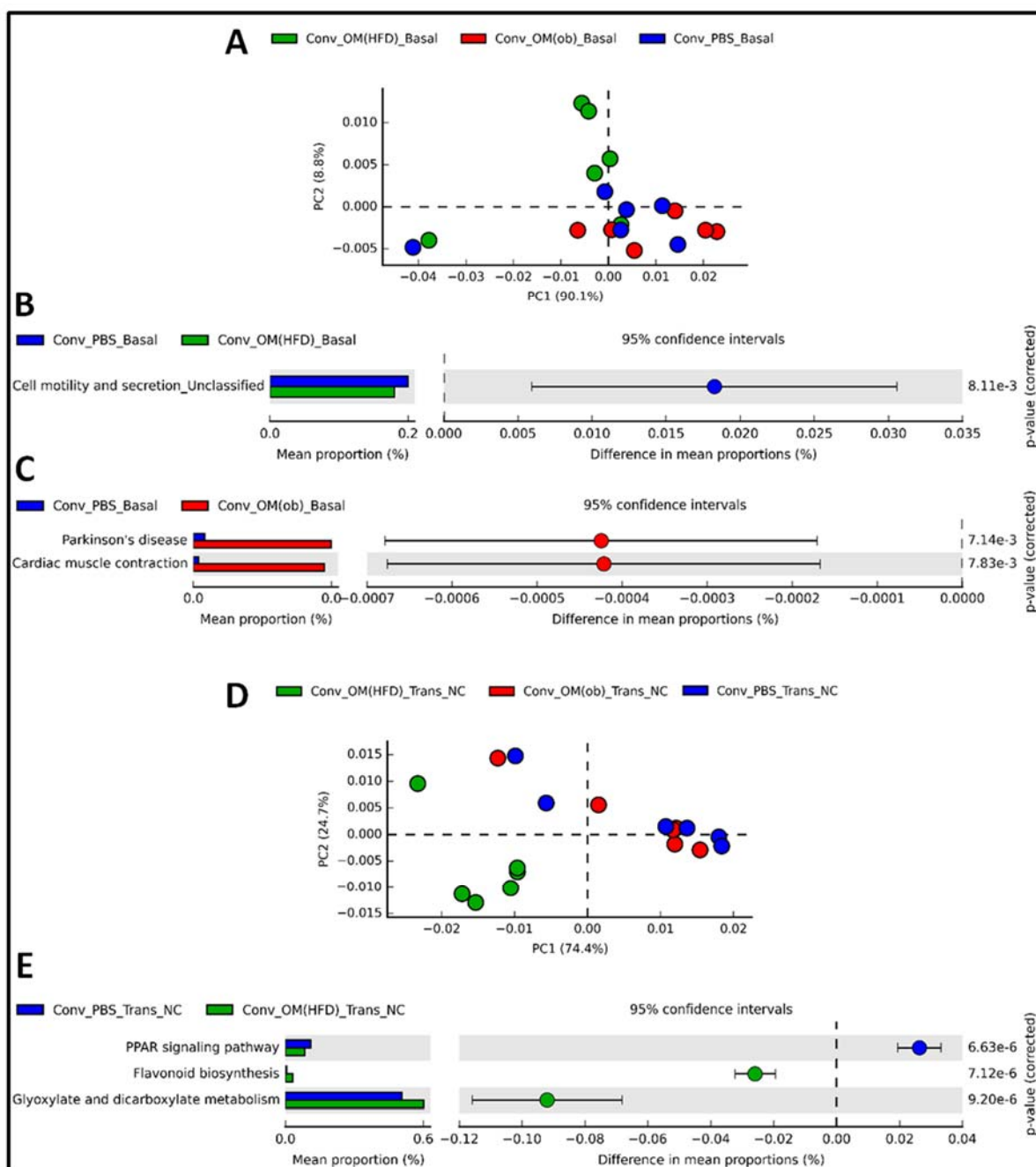


Figure 56: Analyses prédictives des fonctions microbiennes significativement modifiées entre les trois groupes de souris Conv +PBS, Conv + OM(ob) et Conv + OM(HFD) avant et après le transfert de microbiote lors du protocole #2.

Les résultats présentés en (A, B et C) ont été générés à partir des données obtenues par le pyroséquençage du microbiote fécal prélevé en condition basale (avant le transfert caecal). Une analyse prédictive des fonctions bactériennes potentiellement modifiées en condition basale (avant le transfert caecal) entre les 3 groupes de souris Conv + PBS, Conv + OM(ob) et Conv + OM(HFD) a été effectuée par le logiciel PICRUST. (A) Représentation en analyse en composantes principales (PCA) de la distribution des souris dans l'espace en fonction des modifications des voies métaboliques bactériennes obtenue par PICRUST. (B) Fonctions bactériennes significativement modulées entre les groupe Conv + PBS et Conv + OM(HFD) (C) Fonctions bactériennes significativement modulées entre les groupe Conv + PBS et Conv + OM(ob) (n=6 souris par groupe). Les résultats présentés en (D et E) ont été générés à partir des données obtenues par le pyroséquençage du microbiote fécal prélevé 3 semaines après le transfert caecal (Trans NC). Une analyse prédictive des fonctions bactériennes potentiellement modifiées 3 semaines après le transfert caecal (Trans NC) entre les 3 groupes de souris Conv + PBS, Conv + OM(ob) et Conv + OM(HFD) a été effectuée par le logiciel PICRUST. (D) Représentation en analyse en composantes principales (PCA) de la distribution des souris dans l'espace en fonction des modifications des voies métaboliques bactériennes obtenues par PICRUST. (E) Fonctions bactériennes significativement modulées entre les groupe Conv + PBS et Conv + OM(HFD). (n=6 souris par groupe).

L'analyse fonctionnelle du microbiote intestinal entre les groupes après le régime hyperlipidique met en lumière des voies métaboliques modifiées entre les 3 groupes de souris (Fig. 57).

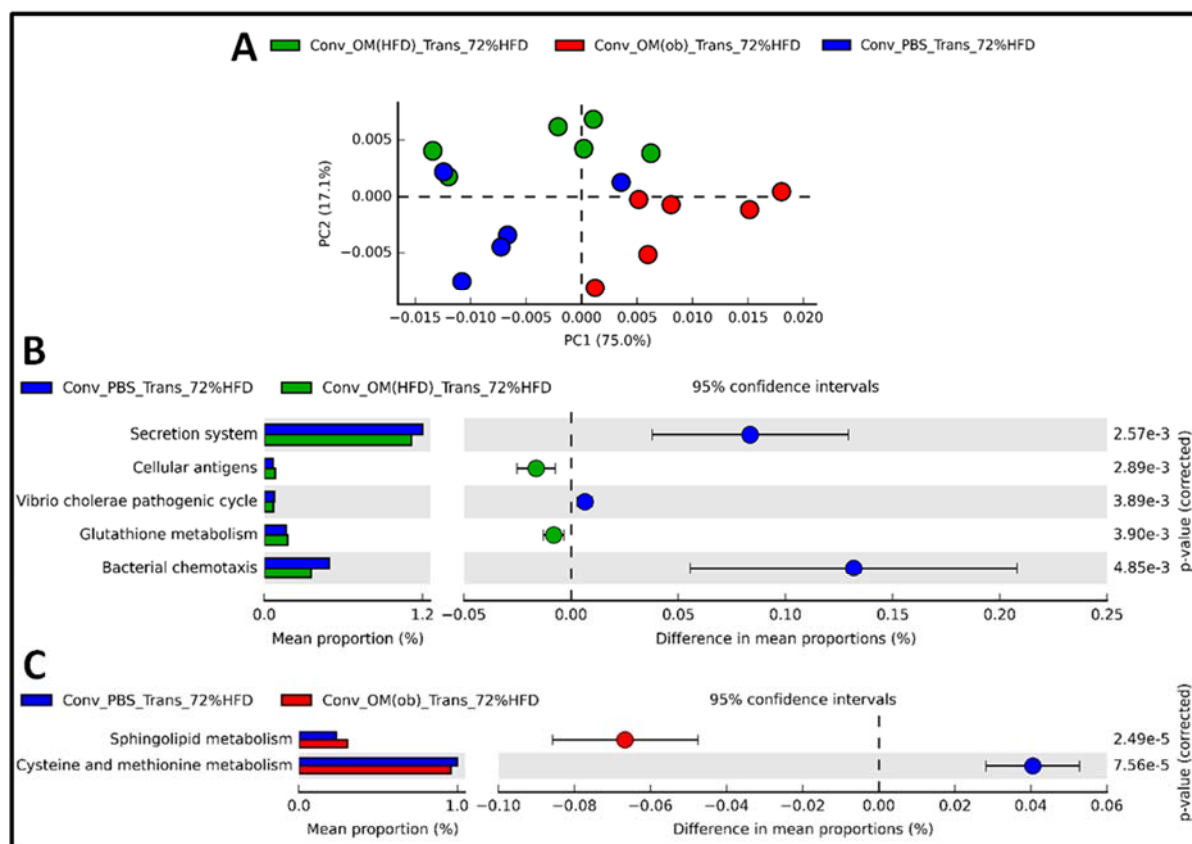


Figure 57: Analyses prédictives des fonctions microbiennes significativement modifiées entre les 3 groupes de souris Conv + PBS, Conv + OM(ob) et Conv + OM(HFD) après 6 semaines de régime hyperlipidique (Trans 72%HFD) lors du protocole #2.

L'ensemble des résultats présentés sur la figure a été généré à partir des données obtenues par le pyroséquençage du microbiote fécal prélevé après 6 semaines de régime hyperlipidique (condition Trans 72%HFD). Une analyse prédictive des fonctions bactériennes potentiellement modifiées entre les 3 groupes de souris Conv + PBS, Conv + OM(ob) et Conv + OM(HFD) a été effectuée par le logiciel PICRUSt. (A) Représentation en analyse en composantes principales (PCA) de la distribution des souris dans l'espace en fonction des modifications des voies métaboliques bactériennes obtenues par PICRUSt. (B) Fonctions bactériennes significativement modulées entre les groupe Conv + PBS et Conv + OM(HFD) (C) Fonctions bactériennes significativement modulées entre les groupe Conv + PBS et Conv + OM(ob) (n=5-6 souris par groupe).

VIII- Les modifications du microbiote intestinal observées chez le groupe Conv + OM(HFD) lors du protocole #1 sont-elles comparables à celles observées lors du protocole #2 ?

Lors de mes travaux de thèse nous avons reproduit le protocole de transfert du microbiote OM(HFD) dans 2 lots de souris différents (**protocole #1** et **#2**). A chaque fois, nous avons mesuré une baisse de la conversion du pyruvate en glucose lors des tests de tolérance au pyruvate effectués chez les souris transplantées. De plus, lors des 2 protocoles de transfert nous avons constaté des modifications du microbiote intestinal des souris transplantées. En partant de ces 2 constats nous avons recoupé les analyses du microbiote intestinal du **protocole #1** et **#2** afin de trouver des bactéries et des voies métaboliques bactériennes éventuellement modifiées de manière similaire lors des 2 protocoles. Ces modifications du microbiote pourraient être impliquées dans le phénotype hépatique observé. La comparaison taxonomique des analyses du microbiote effectuées lors des 2 protocoles a permis de mettre en évidence une augmentation significative du genre bactérien *Allobaculum* à la suite du transfert du microbiote OM(HFD). En effet, la proportion relative de cette bactérie passe de moins de 1% avant le transfert caecal à presque 40% en moyenne après le transfert caecal quel que soit le protocole (**Fig. 58, A**). D'un point de vue fonctionnel, la voie métabolique bactérienne du cycle du glyoxylate a attiré notre attention. La voie du glyoxylate est une voie anabolique alternative au cycle de Krebs utilisée par certaines bactéries. Elle se divise en plusieurs réactions qui permettent la conversion de l'Acétyl-CoA en glucose. Cette voie a été la seule voie significativement augmentée dans le microbiote des souris ayant reçu le microbiote OM(HFD) comparativement aux souris Conv + PBS lors des 2 protocoles (**Fig. 41, C** et **Fig. 56, E**). De plus, l'augmentation de cette voie microbienne corrèle significativement avec la baisse de conversion du pyruvate en glucose chez les souris transplantées (**Fig. 58, B**). On peut donc supposer que l'augmentation de la voie métabolique du cycle du glyoxylate soit en lien avec la diminution de la conversion du pyruvate en glucose chez ces souris.

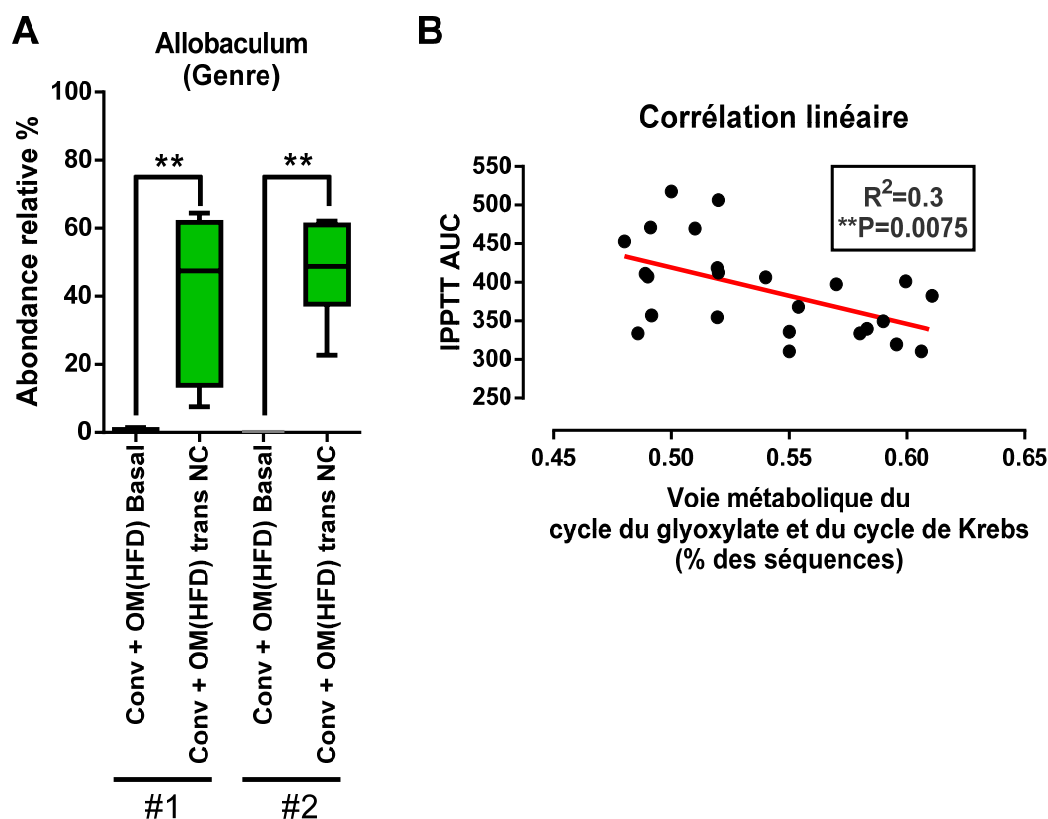


Figure 58: Mise en commun des données de pyroséquençage obtenues lors de protocole #1 et #2 pour les groupes de souris Conv + OM(HFD).

Des souris mâles ont reçu par gavage le microbiote caecal de souris obèses/diabétiques nourries avec un régime hyperlipidique (groupe Conv + OM(HFD) en vert). Ce transfert de microbiote a été réalisé à 2 reprises lors de 2 protocoles indépendants #1 et #2. Lors de chaque protocole, le microbiote des souris receveuses a été analysé avant et après le transfert de microbiote (Basal signifie avant le transfert et Trans NC signifie après le transfert). **(A)** Abondance relative du genre bactérien *Allobaculum* dans les fèces des souris receveuses analysées par pyroséquençage. (#1 correspond au premier protocole et #2 correspond au second protocole). **(B)** Etude de corrélation entre l'aire sous la courbe du test de tolérance au pyruvate et la voie métabolique bactérienne du cycle du glyoxylate et du cycle de Krebs (obtenue par l'analyse PICRUSt). Chaque point représente une souris des groupes Conv + PBS et Conv + OM(HFD) des protocoles #1 et #2. **(A)** Les résultats ont été exprimés en valeurs moyennes \pm l'écart standard à la moyenne (S.E.M). $**p<0.01$ au test T de student effectué entre la condition basale et Trans NC pour chaque protocole.

IX- Quels sont les points communs entre le microbiote des souris Conv + OM(HFD) et Conv + OM(ob) après 6 semaines de régime hyperlipidique ?

Quelle que soit l'origine du « microbiote obèse » ((OM(HFD) et OM(ob)), les 2 groupes de souris ayant reçu ces microbiotes présentent une néoglucogénèse hépatique significativement plus faible que le groupe de souris non transplantées une fois nourries avec un régime hyperlipidique (**Fig. 44**). Afin de relier ce phénotype métabolique avec la composition du microbiote intestinal des souris, nous avons déterminé quelles étaient les bactéries intestinales significativement augmentées dans l'intestin des souris Conv + OM(HFD) et Conv + OM(ob) par rapport aux souris Conv + PBS. L'analyse taxonomique de leur microbiote intestinal nous a permis de mettre en évidence l'augmentation significative de la proportion de la bactérie *Bacteroides vulgatus* (*Bv*) dans l'intestin des 2 groupes de souris transplantées comparativement aux souris non transplantées (**Fig. 59, A**). Ce résultat nous a amené à penser que *Bv* pouvait jouer un rôle dans la diminution de la néoglucogénèse observée. Nous avons donc décidé de supplémenter des souris sous régime normal et sous régime hyperlipidique pendant un mois avec *Bv* afin d'évaluer son impact sur le développement des maladies métaboliques (**Fig. 59, B**). Nous n'avons pas constaté de rôle bénéfique de *Bv* sur la gestion de l'hyperglycémie induite lors d'un test de tolérance au glucose (**Fig. 59, C**). En outre, les souris gavées avec *Bv* et nourries avec un régime hyperlipidique semblent même développer une intolérance au pyruvate plus sévère que les souris non traitées (**Fig. 59, D**).

Malgré l'augmentation significative de la proportion relative de *Bv* dans le fèces des souris Conv + OM(ob) et Conv + OM(HFD), cette souche bactérienne ne semble pas être impliquée dans la diminution de la néoglucogénèse hépatique observée chez ces 2 groupes de souris.

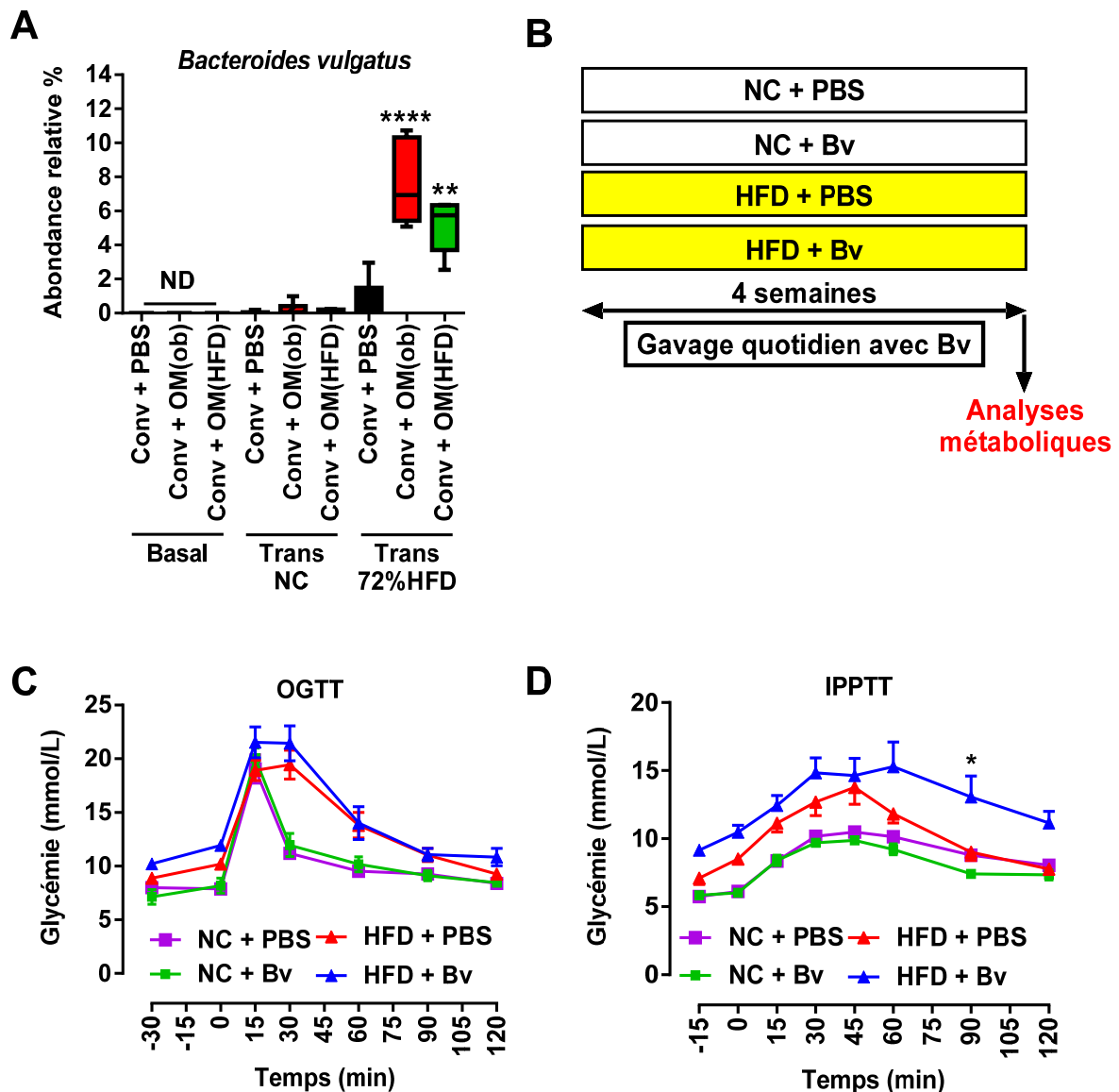


Figure 59: Impact du traitement avec *Bacteroides vulgatus* sur le métabolisme glucidique.

(A) Proportion relative de l'espèce bactérienne *Bacteroides vulgatus* dans les fèces des souris Conv + PBS, Conv + OM(ob) et Conv + OM(HFD) avant le transfert caecal (condition basale), 3 semaines après le transfert caecal sous régime normal (Trans NC) et après 6 semaines de régime hyperlipidique (Trans 72%HFD). (B) Des souris mâles C57Bl/6J de 6 semaines ont été gavées quotidiennement pendant 4 semaines avec 200 μ L d'une suspension contenant 10^8 CFU/mL de la bactérie *Bacteroides vulgatus* (Bv) dans du PBS anaérobie. Ces souris traitées ont été comparées à des souris gavées avec du PBS anaérobie stérile. Pendant toute la durée du traitement, les souris ont été nourries avec un régime normal ou un régime hyperlipidique (72% de lipides, 28% de protéines et moins de 1% de glucides SAFA Augy, France). (C) Après les 4 semaines de traitement, la tolérance au glucose a été mesurée après 6 heures de jeûne. (D) Les souris ont également subi un test de tolérance au pyruvate après 6 heures de jeûne. Les résultats ont été exprimés en valeurs moyennes \pm l'écart standard à la moyenne (S.E.M). (A) ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ au test one-way ANOVA avec un post-test de Dunnett. Les groupes traités ont été comparés au groupe Conv + PBS en condition Trans 72%HFD. (D) * $p < 0.05$ au test two-way ANOVA avec un post-test de Sidak. Le groupe HFD + Bv a été comparé au groupe HFD + PBS.

X- Impact du transfert du microbiote fécal OM(HFD) chez des souris conventionnelles obèses et diabétiques.

Au vue de la baisse de la glycémie à jeun observée chez les souris ayant reçu le microbiote OM(HFD), nous nous sommes demandés si le transfert de ce microbiote dans des souris déjà obèses et diabétiques pouvait induire une baisse de la glycémie. Par ailleurs, afin de se rapprocher de la procédure de transplantation effectuée chez l'Homme nous avons transplanté des souris avec du microbiote issu des fèces des souris donneuses (**cf Introduction III-C-2**). Nous avons réparti les souris obèses/diabétiques en 4 groupes d'études : 5 souris ont été gavées avec du PBS réduit, 5 souris ont reçu le microbiote provenant de souris obèses diabétiques nourries avec un régime hyperlipidique, 5 souris ont reçu le microbiote de souris minces et 5 souris ont reçu leur propre microbiote (**Figure 60**).

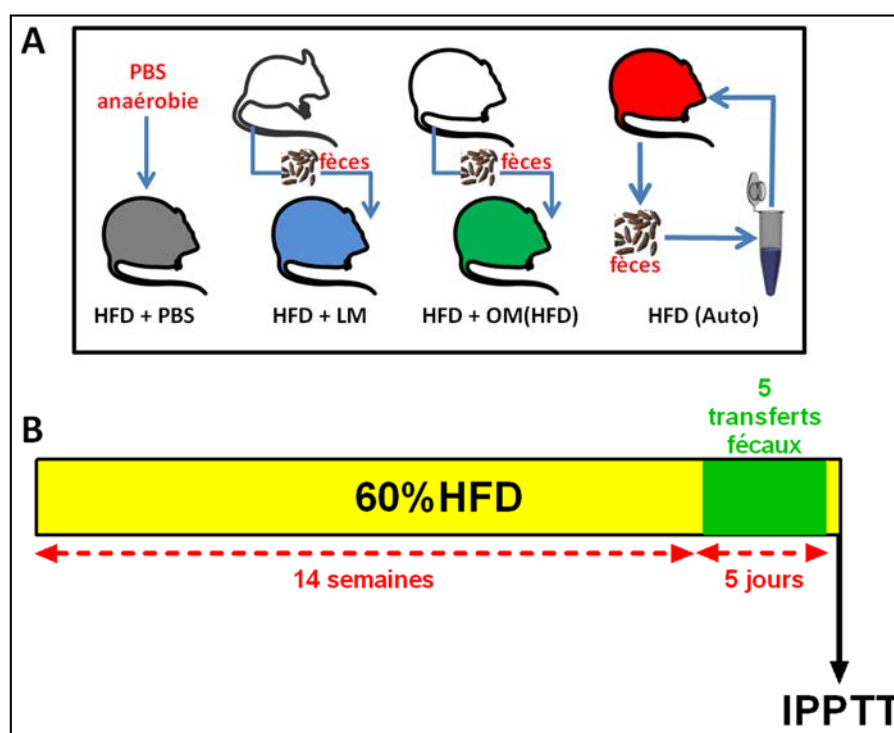


Figure 60: Protocole expérimental du transfert de microbiote FECAL.

Quatre groupes de 5 souris receveuses mâles obèses/diabétiques ont été utilisés. Les souris, âgées de 8 semaines, ont été nourries pendant 14 semaines avec un régime hyperlipidique (60% de lipides, 20% de glucides et 20% de protéines; Research diet #D12492). Ensuite ces souris HFD (HFD pour High Fat Diet) ont reçu le microbiote fécal des souris donneuses nourries sous régime normal (groupe HFD + LM) ou le microbiote d'un autre groupe de souris nourries avec un régime hyperlipidique (groupe HFD + OM(HFD)). Deux groupes contrôles ont été utilisés: des souris ayant reçu leur propres microbiote fécal (groupe HFD (Auto)) et des souris gavée avec du PBS réduit et stérile (groupe HFD + PBS). Les souris n'ont jamais été traitées aux antibiotiques et le microbiote fécal a été administré par gavage tous les jours pendant 5 jours consécutifs (volume de gavage 200 μ L à une concentration de 80 mg de fèces par mL de suspension). Les suspensions microbiennes n'ont jamais été congelées et des fèces fraîches ont été prélevées chaque jour juste avant le transfert pour réaliser la suspension de gavage.

Cette procédure de transplantation n'a pas affecté la prise alimentaire des souris (**Fig. 61, A**) et leur poids corporel (**Fig. 61, B**). Cependant, le transfert du « microbiote obèse HFD » a induit une diminution significative de la glycémie lors d'un test de tolérance au pyruvate chez des souris nourries pendant 14 semaines avec un régime hyperlipidique comparativement aux 2 groupes contrôles (**Fig. 61, C**). De manière intéressante les souris ayant reçu leurs propres fèces n'ont pas présenté de modification de leur glycémie comparativement aux souris non transplantées (**Fig. 61, C**).

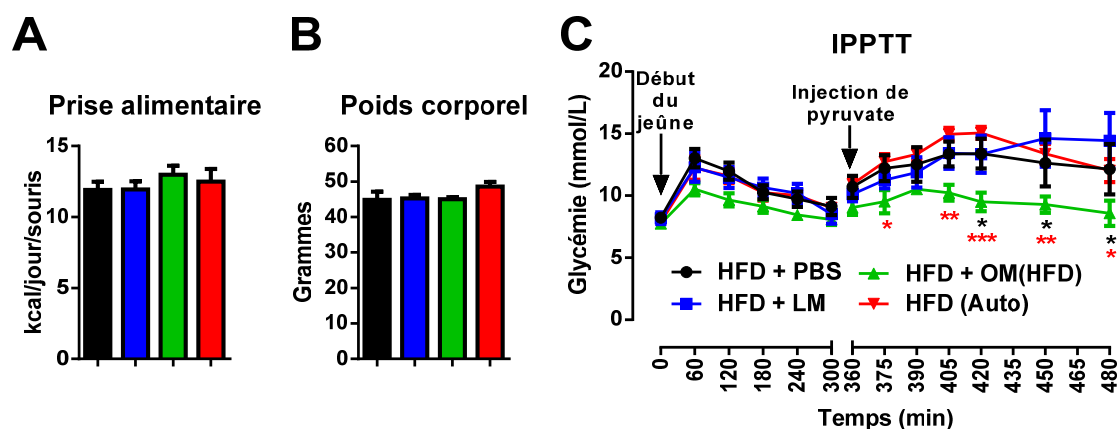


Figure 61: Le transfert d'un microbiote obèse induit une baisse de la glycémie lors d'un test de tolérance au pyruvate chez des souris obèses/diabétiques.

(A) La prise alimentaire a été mesurée chaque jour pendant toute la durée du transfert fécal. (B) Les souris ont été pesées 3 jours après le dernier gavage de microbiote fécal. (C) Cinétique de la glycémie au cours du jeûne avant et pendant le test de tolérance au pyruvate. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ au test two-way ANOVA suivi du post-test de Dunnett. Les groupes traités ont été comparés au groupe contrôle HFD (Auto) (étoiles rouges) et au groupe HFD+PBS (étoile noires), seul le groupe HFD + OM(HFD) a présenté des différences significatives. (n=5 souris par groupe).

XI- Impact du transfert d'un microbiote de souris obèses/diabétiques chez des souris invalidées pour le gène NOD 2.

Plusieurs articles scientifiques publiés par mon équipe d'accueil et d'autres groupes à travers le monde ont démontré que l'activation de plusieurs récepteurs comme TLR4, CD14, TLR5 et encore NOD 1 avec des composés bactériens pouvaient induire une inflammation et conduire au développement des maladies métaboliques^{29,216,219,254}. Plus récemment des travaux auxquels a participé mon équipe d'accueil ont démontré qu'à l'inverse, l'inactivation du récepteur de reconnaissance bactériens NOD 2 (Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2) chez la souris pouvait conduire à l'exacerbation de l'insulinorésistance et favoriser l'apparition des maladies métaboliques lors de la consommation d'un régime hyperlipidique²⁵⁵. De plus, l'absence du récepteur NOD 2 favorise la translocation des bactéries intestinales lors d'un régime hyperlipidique²⁵⁵. Au vue des effets délétères de l'absence du récepteur NOD 2 sur le métabolisme et de sa capacité à reconnaître des composés bactériens issus du microbiote, nous nous sommes demandés si les effets du transfert d'un microbiote issu de souris obèses/diabétiques observés lors de ma thèse n'impliquaient pas le récepteur NOD 2. Pour répondre à cette question nous avons entrepris de transplanter des souris NOD 2 KO avec le microbiote caecal OM(HFD) et OM(ob). La procédure de transfert utilisée a été la même que lors du **protocole #1** et **#2**. De manière intéressante, nous n'avons pas retrouvé la diminution de conversion du pyruvate en glucose lors des transferts des microbiotes issus de souris obèses (OM(HFD) et OM(ob)) chez les souris invalidées pour NOD 2 comparativement au souris NOD 2 non transplantées (**Fig. 62**). Ces résultats suggèrent que l'effet du transfert de microbiote des souris obèses/diabétiques nécessite l'activation de NOD 2.

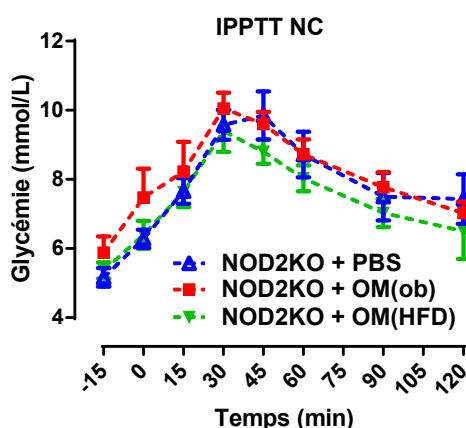


Figure 62: Impact du transfert de microbiote sur la tolérance au pyruvate des souris invalidées pour le gène NOD 2.

Quatre groupes de 4-6 souris males âgées de 6 semaines invalidées pour le gène NOD 2 ont reçu le microbiote caecal de souris nourries avec un régime hyperlipidique (groupe NOD 2 KO + OM(HFD) en vert) ou le microbiote de souris ob/ob nourries avec régime normal (groupe NOD 2 KO + OM(ob) en rouge). Le groupe de 6 souris contrôles invalidées pour NOD 2 a reçu du PBS anaérobie par gavage (groupe NOD 2 KO + PBS en bleu). Les souris receveuses ont été nourries avec un régime normal. Trois semaines après le transfert, un test de tolérance au pyruvate a été effectué. Les résultats ont été exprimés en valeurs moyennes \pm l'écart standard à la moyenne (S.E.M).

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons traité des souris conventionnelles sous régime normal pendant 4 jours avec le muramyl dipeptide (MDP) un agoniste spécifique de NOD 2 (**Fig. 63**). Comme attendu, le traitement avec le MDP a induit une activation du système immunitaire et les souris traitées ont présenté une augmentation significative des leucocytes dans le sang circulant et en particulier des monocytes (**Fig. 63, A**). Cependant le traitement n'a pas modifié significativement la tolérance au pyruvate ce qui laisse penser que l'activation de NOD 2 seul n'est pas capable de reproduire le phénotype observé lors du transfert de microbiote (**Fig. 63, B**). Par ailleurs, il serait intéressant d'analyser le microbiote intestinal présent chez les souris NOD 2 avant et après le transfert caecal. Des travaux auxquels mon équipe d'accueil a participé ont montré que les souris NOD 2 KO étaient caractérisées par un microbiote différent de celui retrouvé dans les souris sauvages²⁵⁵. On peut donc penser que ces différences de microbiote endogène ont pu moduler l'impact du transfert de microbiote issu de souris obèses/diabétiques et ainsi conduire à l'absence de phénotype observé.

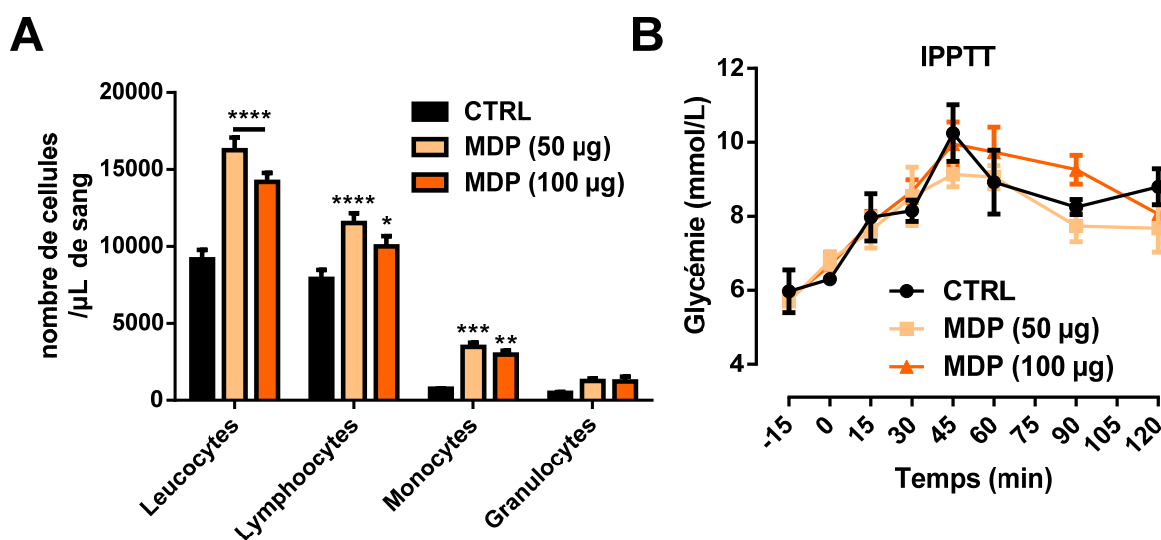


Figure 63: Effet d'un traitement au Muramyl DiPeptide (MDP) sur la tolérance au pyruvate.

Trois groupes de 5 souris mâles âgées de 6 semaines et nourries sous régime normal ont été traités pendant 4 jours consécutifs avec une injection intra-péritonéale de MuramylDiPeptide (MDP), un agoniste spécifique du récepteur NOD 2. Le groupe contrôle (CTRL) a reçu une injection quotidienne de solvant (eau stérile), le groupe MDP 50 µg a reçu une injection quotidienne de 50 µg de MDP et le groupe MDP 100 µg a reçu une injection quotidienne de 100 µg de MDP. (A) Après les 4 jours de traitement la numération de la formule sanguine a été effectuée. (B) Les souris ont également subi un test de tolérance au pyruvate après 6 heures de jeûne. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$ au test two-way ANOVA suivi du post-test de Dunnet. Les groupes traités ont été comparés au groupe CTRL.

Discussion

Lors de mes travaux de thèse, nous avons transféré, dans des souris conventionnelles non traitées aux antibiotiques, le microbiote contenu dans le caecum de 2 types de souris obèses et diabétiques (« microbiote obèse ») : des souris nourries avec un régime hyperlipidique (« microbiote obèse HFD ») et des souris ob/ob invalidées pour le gène codant pour la leptine (« microbiote obèse ob »). Comme contrôle nous avons utilisé des souris non transplantées et des souris transplantées avec un microbiote de souris minces (« microbiote mince »). Contre toutes attentes, le transfert du « microbiote obèse » a induit une diminution de la glycémie à jeun associée à une baisse de la néoglucogenèse hépatique chez les souris conventionnelles transplantées. A l'inverse, le transfert du « microbiote mince » n'a pas modifié la néoglucogenèse. De manière intéressante, une fois nourries avec un régime hyperlipidique les souris ayant reçu le « microbiote obèse » ont conservé une glycémie à jeun plus faible que les souris non transplantées. Là encore, ce phénotype résulte d'une diminution de la production hépatique de glucose expliquée par une baisse de l'activité de la PEPCK et de la G6Pase 2 enzymes limitantes de la voie néoglucogénique. En conclusion, nous avons montré que le transfert d'un « microbiote obèse » peut moduler le métabolisme hépatique et prévenir l'augmentation de la néoglucogenèse hépatique normalement induite par le régime hyperlipidique.

I- Le choix du protocole de transfert caecal

Au départ de ma thèse, très peu d'études utilisaient les souris conventionnelles comme souris receveuses de microbiote. Les rares articles à pratiquer un transfert de microbiote entre 2 souris utilisaient les méthodes de cohabitat et d'adoption croisées décrites dans l'introduction (**cf Introduction III-C-2**). Au départ du projet, la question quant au traitement préalable des souris receveuses aux antibiotiques s'est posée. Ce traitement est décrit dans plusieurs articles scientifiques et lorsqu'il est utilisé, il est censé permettre l'élimination du microbiote endogène afin de faciliter l'implantation des bactéries issues du transplant. Néanmoins, un article paru en 2010 a comparé l'efficacité de la transplantation d'un microbiote caecal chez des rats traités aux antibiotiques et des rats non traités²⁴⁶. Le traitement antibiotique a bien éliminé en grande partie le microbiote endogène, mais l'implantation du microbiote exogène s'est avérée moins efficace chez les rats traités²⁴⁶. De plus, les antibiotiques sont souvent utilisés en cocktail à forte dose (vancomycine, néomycine, metronidazol et ampicilline en même temps) et sur plusieurs jours. Avec ce type de traitement, il est fort probable que les effets des antibiotiques ne se résument pas à leurs actions locales sur le microbiote endogène. Par exemple, le metronidazol est principalement oxydé au niveau du foie et éliminé dans les urines. Plusieurs études de cas ont même montré, chez l'Homme, des insuffisances hépatiques sévères causées par une intoxication au metronidazole^{256,257}. Par conséquent, au départ de notre étude nous ne voulions pas induire de facteurs confondants en traitant des souris aux antibiotiques avant la transplantation. De plus, une nouvelle étude récente publiée dans *Science* a montré que

l'implantation du microbiote d'un donneur dans l'intestin d'un receveur pouvait s'effectuer en l'absence de traitement préalable aux antibiotiques²⁴⁸.

D'autre part, nous avons gavé les souris receveuses avec le microbiote des souris donneuses à 2 reprises. Chez l'Homme, lors du traitement des infections à *Clostridium difficile* par transplantation fécale, une étude a montrée qu'en cas d'absence de disparition de l'infection après une première inoculation de microbiote, une deuxième inoculation pouvait s'avérer efficace²³⁹. Par ailleurs, chez l'Homme un autre essai clinique a également eu recours à plusieurs inoculations successives chez les mêmes patients pour le traitement à *Clostridium difficile*²³⁵. Nous avons donc opté pour une procédure de transfert comprenant 2 gavages de microbiote afin de potentialiser son effet.

Après les 2 gavages successifs, nous avons choisi de commencer les études métaboliques chez les souris receveuses 3 semaines après le deuxième gavage. Ce laps de temps relativement long a été adopté dans le but d'éviter les effets aigus éventuellement associés au protocole de transfert de microbiote. En effet, la mesure de la numération leucocytaire effectuée 48 heures après le premier gavage nous a montré que quelque soit l'origine du microbiote transféré (« microbiote obèse HFD » ou « microbiote mince ») les souris présentaient un nombre circulant significativement plus important de toutes des populations de leucocytes circulants (lymphocytes, monocytes ou granulocytes) que les souris contrôles gavées avec du PBS. Cependant, 3 semaines après le deuxième gavage, lors des analyses métaboliques, la numération leucocytaire n'était plus différente entre les 3 groupes de souris. Par conséquent, analyser le métabolisme 3 semaines après le deuxième gavage nous a permis de se placer à distance de la réponse immunitaire aigue induite par le transfert de microbiote.

II- Effet du transfert de microbiote sur le microbiote des souris receveuses

A. Le microbiote des souris receveuses présente des différences avant le transfert caecal

Avant le transfert caecal, les souris receveuses ont été réparties aléatoirement afin de former des groupes de 6 souris par cage. Toutes les souris d'une même cage ont reçu le même microbiote afin d'éviter le transfert de bactéries d'un groupe de souris à l'autre par coprophagie. En effet, les souris mangent les fèces présentes dans la litière et par conséquent les souris s'inoculent naturellement le microbiote de leurs congénères. Dès lors, mélanger, dans une même cage, des souris ayant reçu des microbiotes différents aurait conduit au transfert du microbiote d'un groupe de souris à l'autre rendant difficile l'interprétation des résultats.

De manière surprenante, nous avons constaté des différences significatives entre le microbiote des différents groupes de souris avant le transfert caecal. En d'autres termes, chaque cage de souris était caractérisée par un microbiote spécifique et cela en l'absence du moindre

traitement préalable et malgré la répartition aléatoire des souris au départ. Ces différences ont été mesurées alors que les souris provenaient du même fournisseur (Charles River), avaient le même âge et étaient nourries avec le même régime. De plus, tous les prélèvements de fèces ont été réalisés au même moment. La répartition au sein des cages a semblé être le seul facteur impliqué dans ces différences de microbiote mesurées. Nous ne sommes pas les seuls à avoir observé des microbiotes différents entre plusieurs cages de souris en absence de traitement. En effet, Less H. *et al.* ont réparti 6 rats sauvages, 6 rats hétérozygotes et 6 rats homozygotes invalidés pour le récepteur à la leptine dans 6 cages différentes de telle sorte à avoir un rat sauvage, un rat hétérozygote et un rat homozygote dans chaque cage¹⁷¹. Les auteurs ont constaté que quel que soit le génotype, les 3 rats issus d'une même cage arboraient un microbiote similaire et significativement différent des 3 rats d'une autre cage. Dans cette étude, l'environnement (*i.e.* la cage d'élevage) est apparu comme le facteur essentiel influençant la composition du microbiote¹⁷¹. Ces résultats méritent d'être mieux pris en considération par la communauté scientifique car beaucoup d'études comparent les microbiotes issus de groupes de souris nées et élevées dans des environnements différents. Dès lors, il est difficile de savoir si les différences microbiennes entre les 2 groupes de souris sont le fruit de l'environnement ou non.

B. Comment évaluer l'impact du transfert de microbiote sur le microbiote des souris receveuses ?

Afin d'évaluer l'impact du transfert de microbiote sur le microbiote des souris receveuses nous avons comparé le microbiote présent dans chaque souris avant et après le transfert. Le microbiote des souris contrôles (gavées avec du PBS stérile) a présenté des différences significatives entre les 2 prélèvements. Si l'on considère que le PBS n'a pas modifié de manière significative le microbiote, alors le temps et l'avancée en âge des souris a semblé être un facteur capable d'induire les modifications du microbiote observées. L'impact du temps sur le microbiote a déjà été observé auparavant dans plusieurs études. Par exemple, Less H. *et al.* ont suivi l'évolution de la composition du microbiote présent chez des rats au cours du temps sans jamais les traiter ou les changer d'environnement (les rats ont toujours été élevé au sein des mêmes cages)¹⁷¹. Ils ont mis en évidence des variations au cours du temps du microbiote des rats sur une période relativement courte (entre 5 et 14 semaines d'âge pour les animaux). Ces résultats montrent que le facteur temps peut, à lui seul, modifier significativement le microbiote intestinal chez le rongeur. Cette observation met en évidence l'importance d'analyser les microbiotes des souris avant et après le transfert de microbiote afin de pouvoir quantifier l'effet du temps sur le microbiote dans notre étude. En effet, grâce à cette étude basale nous avons pu mesurer des variations taxonomiques significativement plus importantes lors du transfert des souris receveuses avec un « microbiote obèse HFD » comparativement aux souris gavées avec du PBS réduit. Nous avons également mesuré les fonctions potentielles exercées par le microbiote par PICRUSt. Chez les souris ayant reçu le microbiote « microbiote obèse HFD » nous avons constaté un plus grand nombre de voies métaboliques microbiennes modifiées (20 voies) comparativement aux souris non transplantées (3 voies). Ces résultats laissent donc penser que le transfert d'un « microbiote obèse HFD » a modifié plus fortement le microbiote intestinal des souris receveuses que le simple effet du temps.

Dans notre étude, afin de pouvoir comparer l'évolution du microbiote des souris transplantées au cours du temps, nous avons décidé d'analyser le microbiote fécal. Le microbiote contenu dans les fèces est facile d'accès et ne nécessite pas le sacrifice des souris pour être prélevé. Cependant, l'inoculation de microbiote intestinal a été effectuée par voie orale (gavage) et il est probable que cette procédure ait induit des modifications du microbiote contenu dans les parties proximales de l'intestin. Ces modifications potentielles ont pu passer inaperçues avec l'analyse des fèces. En effet, Vrieze A. *et al.*, ont transplanté des hommes en surpoids et diabétiques avec le microbiote issu des fèces des patients sains. Le transfert du microbiote intestinal d'une personne maigre a permis d'augmenter la sensibilité à l'insuline chez la plupart des patients diabétiques traités. Chez ces patients, cet effet métabolique a été associé à des modifications du microbiote fécal mais aussi du microbiote de l'intestin grêle. Ce microbiote était caractérisé entre autres par une augmentation des bactéries productrices d'acides gras à chaîne courte²⁴¹. Il serait donc intéressant de quantifier les modifications du microbiote dans les segments proximaux de l'intestin grêle dans notre modèle murin de transfert de microbiote.

Par ailleurs, nous n'avons pas été en mesure de déterminer si les bactéries présentes dans la suspension de transplant se sont implantées durablement au sein du microbiote des souris receveuses. Récemment une étude publiée par Li S.S. *et al.*, a pu évaluer l'implantation des bactéries administrées lors d'une transplantation fécale grâce à l'étude des SNP (Single Nucleotide Polymorphism) présents au sein du génome des bactéries (pour plus de détails voir **Introduction III-C-2**)²⁴⁸. Les auteurs ont alors pu montrer que l'implantation des bactéries provenant du transplant était possible mais que la proportion capable de s'implanter était variable suivant les individus²⁴⁸. Au commencement de mon projet de thèse, nous avons émis l'hypothèse que si des bactéries étaient présentes dans le microbiote des souris receveuses uniquement après le transfert et pas en condition basale, c'est que ces bactéries avaient émergées grâce à ce transfert. Cependant, Li S.S. *et al.* ont pu estimer, chez des individus sains non traités, qu'entre 2 analyses des microbiotes fécaux espacées de seulement quelques jours, environ 20% des espèces identifiées dans le deuxième échantillon n'ont pas été détectées lors du premier prélèvement²⁴⁸. Par conséquent, dans notre étude, l'apparition de certaines espèces bactériennes dans le microbiote des souris receveuses après le transfert de microbiote n'était pas forcément due à la procédure de transplantation. De manière plus générale, les résultats de Li S.S. *et al.* peuvent suggérer 3 choses : soit, comme le discute les auteurs, 20% de nouvelles espèces peuvent apparaître au sein du microbiote en seulement quelques jours, soit la technique d'analyse du microbiote est peu reproductible, soit le microbiote d'une seule fèces constitue un échantillon bactérien biaisé. Une étude menée par Voigt A.Y. *et al.* a cherché des réponses à ces questions²⁵⁸. Dans cette étude, les auteurs ont montré que l'impact de la variabilité technique (comme temps de congélation de l'échantillon, la technique d'extraction ou le séquençage) sur la reproductibilité de l'analyse du microbiote était minime. Par ailleurs, comme Li S.S. *et al.*, les auteurs précisent que la variabilité au cours du temps du microbiote d'un même individu n'est pas négligeable²⁵⁸. Au cours de ma thèse et dans la grande majorité des travaux de la littérature il est admis qu'une fèces prélevée à un instant t est un bon reflet du microbiote intestinal de l'individu. Néanmoins, à l'avenir il serait peut-être judicieux d'analyser le microbiote d'un individu à partir de plusieurs fèces pour disposer d'une vision plus complète de la composition de son microbiote intestinal.

C. Analyses des modifications du microbiote des souris receveuses

Lors de mes travaux de thèse nous avons reproduit le protocole de transfert de « microbiote obèse HFD » dans 2 lots de souris différents. A chaque fois, nous avons mesuré une baisse de la conversion du pyruvate en glucose lors des tests de tolérance au pyruvate effectués chez les souris transplantées. La comparaison des analyses du microbiote effectuées lors des 2 protocoles a permis de mettre en évidence une augmentation significative du genre bactérien *Allobaculum* à la suite du transfert du « microbiote obèse HFD ». Ce genre bactérien a déjà été associé aux maladies métaboliques dans plusieurs articles scientifiques. Par exemple, le traitement de rats avec de la berbérine, un alcaloïde d'origine végétale, prévient le développement des maladies métaboliques sous régime hyperlipidique et est associé avec l'augmentation significative du genre *Allobaculum* dans le microbiote des souris traitées²⁵⁹. Les mêmes résultats ont été obtenus lors du traitement des rats à la metformine, une molécule connue pour inhiber la néoglucogenèse hépatique²⁶⁰. D'autre part, la consommation d'un régime pauvre en graisses est associée avec une augmentation relative du genre *Allobaculum*²⁶¹. Enfin, Everard A. *et al.*, ont montré que la consommation d'un régime hyperlipidique s'accompagnait d'une diminution du genre *Allobaculum*²⁶². De plus, dans cette étude, la prévention de la survenue des désordres métaboliques chez des souris nourries avec un régime hyperlipidique par un traitement prébiotique a été associée avec une augmentation du genre *Allobaculum*²⁶². Toutes ces associations laissent penser que l'augmentation du genre *Allobaculum* chez les souris ayant reçu le « microbiote obèse HFD » pourrait être impliquée dans le phénotype hépatique que nous avons observé.

Dans notre étude, l'analyse taxonomique du microbiote intestinal a été enrichie avec l'identification, par l'analyse PICRUSt, des fonctions potentielles exercées par les bactéries intestinales. La voie métabolique microbienne du cycle du glyoxylate a attiré notre attention. La voie du glyoxylate est une voie anabolique utilisée par certaines bactéries (ou par des plantes) mais elle n'est pas présente chez l'Homme ou la souris. Elle se divise en plusieurs réactions qui permettent la conversion de l'Acétyl-CoA en glucides. Cette voie a été la seule voie significativement augmentée dans le microbiote des souris ayant reçu le « microbiote obèse HFD » lors des 2 protocoles. De plus, l'augmentation de cette voie microbienne corrèle significativement avec la baisse de conversion du pyruvate en glucose chez les souris transplantées. On peut donc supposer que l'augmentation de la voie métabolique du cycle du glyoxylate soit en lien avec la diminution de la conversion du pyruvate en glucose chez ces souris. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de cibler cette voie métabolique procaryote et de voir si la conversion du pyruvate en glucose est modulée. Il existe des composés, comme l'acide itaconique, qui sont capables d'inhiber une enzyme impliquée dans le cycle du glyoxylate et donc d'éliminer les bactéries dépendantes de ce cycle. Dans un article publié dans les années 50, les auteurs ont d'ailleurs traité quotidiennement et par voie orale des chats avec ce composé pendant 14 semaines et ils n'ont pas constaté d'effet secondaire majeur pour une dose de 100 mg/kg²⁶³. Il pourrait donc être envisagé de traiter des souris avec ce composé afin de déterminer si l'inhibition pharmacologique de la voie du glyoxylate module le phénotype observé lors du test de tolérance au pyruvate.

Dans notre étude, des souris conventionnelles ont été inoculées avec le microbiote provenant de 2 types de souris obèses : des souris nourries avec un régime hyperlipidique et des souris ob/ob. Nous avons observé chez les 2 groupes de souris transplantées une baisse de la conversion du pyruvate en glucose lors d'un test de tolérance de pyruvate comparativement à des souris non transplantées. Par la suite nous avons nourri ces souris avec un régime hyperlipidique connu pour induire une intolérance au glucose et une augmentation de la néoglucogenèse hépatique. Une fois nourris avec ce régime hyperlipidique, les 2 groupes de souris transplantées ont conservé la baisse de conversion du pyruvate en glucose observée sous régime normal. L'analyse taxonomique de leurs microbiotes intestinaux nous a permis de mettre en évidence l'augmentation significative de la proportion de la bactérie *Bacteroides vulgatus* (Bv) dans l'intestin des 2 groupes de souris transplantées comparativement aux souris non transplantées. Cette souche bactérienne n'est pas inconnue de la communauté scientifique et elle a déjà été associée aux maladies métaboliques aussi bien chez l'Homme que chez le rongeur. En effet Bervoets L. *et al.*, ont comparé le microbiote intestinal d'enfants obèses et d'enfants maigres et ils ont constaté une diminution significative de l'abondance relative de Bv chez les enfants obèses²⁶⁴. Dans une autre étude, Duca F.A. *et al.* ont mis en évidence qu'au sein d'une population de rats nourris avec un régime hyperlipidique, les rats résistants au développement des maladies métaboliques avaient une proportion significativement plus importante de Bv dans leur microbiote²⁶⁵. Néanmoins, ces dernières données sont entachées de résultats frauduleux et Duca F.A. *et al.* ont rétracté leurs travaux suite à la fabrication de plusieurs figures²⁶⁶. En conséquence, il n'est évidemment plus possible de s'appuyer sur ces travaux. Ceci étant mentionné, nos résultats et les données collectées chez les enfants obèses nous ont amené à penser que Bv pouvait jouer un rôle protecteur dans le développement des maladies métaboliques. C'est pourquoi nous avons décidé de compléter des souris sous régime normal et sous régime hyperlipidique pendant un mois avec Bv afin d'évaluer son impact sur le développement de ces dernières. Malheureusement, le traitement avec Bv n'a pas modifié l'homéostasie glucidique des souris gavées. Ces résultats laissent donc penser que la souche de Bv utilisée lors de ma thèse n'est pas impliquée dans la régulation de la production hépatique de glucose.

III- Le transfert du « microbiote obèse » n'induit pas de désordres métaboliques chez des souris receveuses conventionnelles.

Comme je l'ai déjà mentionné à plusieurs reprises, le transfert du microbiote issu de souris obèses dans l'intestin des souris axéniques est capable d'induire une augmentation de masse grasse^{162,164}, une intolérance au glucose²¹⁴ ou une stéatose plus importante que le transfert d'un microbiote issu de souris mince¹⁰⁷. A la lumière de ces résultats, il est légitime de penser que le transfert des maladies métaboliques d'une souris à l'autre peut s'effectuer par simple transfert de son microbiote intestinal. Certains articles de vulgarisation scientifique vont même plus loin et parlent des maladies métaboliques comme étant des maladies contagieuses

d'origine bactérienne. Lors de ma thèse, je n'ai pas reproduit les résultats obtenus chez la souris axénique dans des souris conventionnelles non traitées aux antibiotiques. En effet, le transfert d'un « microbiote obèse » dans des souris conventionnelles n'a pas induit de prise de masse grasse, d'intolérance au glucose ou de stéatose hépatique. Ces résultats en apparence contradictoires peuvent être expliqués par la différence de maturation du tractus digestif observée entre des souris axéniques et des souris conventionnelles. En effet, les souris axéniques sont caractérisées par un système immunitaire immature et un épithélium intestinal plus perméable que les souris conventionnelles²⁶⁷. Dès lors, la dissémination des composés bactériens dans l'organisme et leur prise en charge par le système immunitaire seront complètement différentes entre des souris conventionnelles et des souris axéniques. La gestion différente des transplants par ces 2 modèles de souris peut expliquer leurs effets distincts sur le métabolisme.

Par ailleurs, il est important de rappeler que le microbiote intestinal constitue un véritable écosystème complexe. Pour que des nouvelles bactéries puissent intégrer cet écosystème il faut qu'une niche écologique soit laissée vacante. Ce concept a été illustré de manière très intéressante dans un article publié dans *Nature* par S.M. Lee *et al.*²⁶⁸. Dans cet article les auteurs ont mono-colonisé des souris axéniques avec une seule souche bactérienne *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*) et après seulement quelques jours 10^{10} bactéries vivantes *B. fragilis* ont été retrouvées dans les fèces des souris axéniques mono-colonisées. Une semaine après le gavage de *B. fragilis*, les auteurs ont tenté de coloniser ces souris avec une autre souche bactérienne de la même famille comme *B. thetaiotaomicron* ou *B. vulgatus*. Ils ont constaté que les espèces *B. thetaiotaomicron* et *B. vulgatus* s'implantaient sans problèmes dans leur intestin et que 30 jours après l'inoculation, les fèces des souris bi-colonisées étaient constituées à la fois de 10^{10} bactéries *B. fragilis* et de 10^{10} *B. thetaiotaomicron* ou *B. vulgatus*. Les auteurs ont ensuite tenté d'inoculer les souris mono-colonisées par *B. fragilis* avec la même espèce bactérienne *B. fragilis*. Les bactéries *B. fragilis* inoculées lors du deuxième gavage pouvaient être distinguées des bactéries déjà présentes dans l'intestin grâce à la présence d'un gène rapporteur dans leur génome. Dans ce cas, les auteurs ont constaté que les bactéries *B. fragilis* inoculées lors du deuxième gavage ne pouvaient pas s'implanter dans une souris axénique déjà colonisée auparavant avec *B. fragilis*. Ces résultats mettent en évidence l'existence de niches écologiques spécifiques de certaines bactéries intestinales. Lorsque cette niche est occupée par une ou plusieurs espèces bactériennes il devient difficile pour d'autres bactéries occupant la même niche, de coloniser l'intestin. Dans l'intestin d'une souris conventionnelle, de nombreuses niches écologiques sont déjà occupées par des bactéries et l'implantation du microbiote issu du transplant n'est pas la même que dans une souris axénique. De plus, dans la souris conventionnelle, les bactéries du transplant vont, si elles s'implantent, cohabiter avec les bactéries déjà présentes dans l'intestin. Cette colonisation différentielle peut expliquer en partie les différences métaboliques observées entre des souris axéniques et des souris conventionnelles ayant reçu le microbiote de souris obèses.

IV- Impact du transfert du « microbiote intestinal obèse » sur le métabolisme des souris receveuses

A. Le transfert caecal a modifié le phénotype hépatique des souris receveuses

Nous avons montré que les souris ayant reçu le « microbiote obèse » présentaient une glycémie à jeun significativement plus faible comparativement à des souris non transplantées. Lors du jeûne, la glycémie est maintenue constante essentiellement grâce à la production hépatique de glucose qui met en jeu la glycogénolyse et la néoglucogenèse. Chez les souris transplantées nous n'avons pas constaté de modification des stocks de glycogène hépatique. Cependant, nous avons mesuré une diminution de la conversion du pyruvate en glucose lors d'un test de tolérance au pyruvate. Ces données ont été associées à une diminution de l'activité de la PEPCK, une enzyme catalysant la première étape limitante de la néoglucogenèse à partir du pyruvate. Ces résultats laissent penser que le transfert d'un microbiote de souris obèse induit une diminution de la néoglucogenèse hépatique.

Par la suite nous avons procédé à une analyse microarray sur le foie des souris transplantées afin d'identifier des gènes impliqués dans le phénotype observé. Cependant, la diminution de la production hépatique de glucose n'a pas été associée à une modification d'expression des gènes directement impliqués dans la voie. Par contre, nous avons pu mettre en évidence la diminution significative de l'expression de gènes de la voie de la lipogenèse *de novo* dans le foie des souris transplantées. Cette voie métabolique permet la formation d'acide gras à partir de l'acétyl-CoA et elle est essentiellement activée dans le foie en période postprandiale. En effet, suite à l'arrivée du glucose alimentaire dans l'organisme, le foie va pouvoir le stocker sous forme de glycogène. Lorsque les stocks de glycogène sont constitués, le glucose excédentaire va alors être converti par les hépatocytes en acide gras grâce à la voie de la lipogenèse *de novo*. Cependant cette voie métabolique n'est pas connue pour être active lors du jeûne chez des souris non obèses. Dans notre étude les souris ont été sacrifiées après 6 heures de jeûne. Dès lors, il est difficile d'interpréter ces résultats du microarrays et la conséquence physiologique d'une éventuelle diminution de la lipogenèse *de novo* à jeun n'est pas connue. De plus, avant de conclure quant à une modification de cette voie métabolique il serait nécessaire de quantifier ces enzymes par western blot ou de doser des métabolites impliqués dans cette voie.

B. Impact différentiel du transfert du microbiote obèse OM(ob) et OM(HFD) dans des souris receveuses conventionnelles

Au cours de ma thèse, nous avons transféré des souris conventionnelles avec le microbiote caecal de souris obèses nourries avec un régime hyperlipidique pendant 3 mois (microbiote OM(HFD)) ou le microbiote de souris obèses ob/ob nourries avec régime normal (microbiote OM(ob)). Quel que soit l'origine du microbiote nous avons mesuré une baisse de la conversion du pyruvate en glucose chez les 2 groupes de souris transplantées 3 semaines après le transfert caecal. Ce phénotype est également retrouvé après 6 semaines de régime hyperlipidique. Néanmoins, ces 2 groupes de souris ne partagent pas tous leurs traits phénotypiques. Après 6 semaines de régime hyperlipidique, les souris ayant reçu le microbiote OM(HFD) ont une taille adipocytaire significativement plus faible de que les souris contrôles ainsi que l'expression de plusieurs gènes inflammatoires significativement augmentés dans l'iléon. Ces paramètres ne sont pas modifiés chez les souris ayant reçu le microbiote de souris ob/ob. De plus, les deux groupes Conv + OM(ob) et Conv + OM(HFD) ont des microbiotes significativement différents après le transfert caecal. Ces résultats ne sont pas surprenant car malgré le fait que les microbiotes OM(HFD) et OM(ob) soit tous les 2 issus de souris obèses/diabétiques, l'origine des modifications du microbiote sont complètement différentes. En effet, comme nous l'avons détaillé dans l'introduction (**cf Introduction I-C-2**)), le régime alimentaire influence drastiquement la composition du microbiote. Or, nos 2 groupes de souris donneuses ne sont pas nourris avec le même régime : un groupe de souris donneuses est nourri avec un régime hyperlipidique et le groupe de souris ob/ob est nourri avec un régime normal. Dans un article paru en 2010, E.F. Murphy *et al.* ont comparé les microbiotes intestinaux de souris ob/ob et de souris nourries avec un régime hyperlipidique¹⁶⁸. Dans les 2 cas, ces 2 groupes de souris avaient des microbiotes significativement différents des souris contrôles minces nourries avec un régime normal. Néanmoins, les microbiotes des souris ob/ob et des souris nourries avec un régime hyperlipidique n'étaient pas identiques¹⁶⁸. Par conséquent, les différences phénotypiques observées lors de ma thèse entre les groupes Conv + OM(HFD) et Conv + OM(ob) ne sont pas surprenantes car les 2 groupes de souris ont été transplantés avec des « microbiotes obèses » différents.

C. Par quels mécanismes le transfert de microbiote pourrait-il modifier la néoglucogenèse hépatique ?

La communication entre le microbiote intestinal et le foie est, avant tout, une communication directe *via* la veine porte. En effet, la grande majorité des composés hydrosolubles absorbés au niveau de l'intestin passent dans le sang portal et sont acheminés jusqu'au foie avant de rejoindre la circulation sanguine systémique. Plusieurs exemples de métabolites ou d'antigènes bactériens capables de rejoindre la circulation systémique ont été

mis en évidence dans la littérature. Le mieux décrit concerne le LPS. En effet, plusieurs articles ont montré qu'il pouvait passer la barrière intestinale et être acheminé jusqu'au foie. Dans le foie, le LPS est pris en charge par les cellules de Kupffer et reversé à nouveau dans l'intestin par les voies biliaires. Lors d'une rupture de la barrière intestinale (altération des jonctions serrées par exemple) il est constaté une augmentation du passage du LPS dans la veine porte responsable de l'activation du système immunitaire hépatique. Ce passage accru a été constaté aussi bien chez l'Homme que chez le rongeur lors du développement des maladies métaboliques et de la stéatose hépatique. Au cours de ma thèse, nous avons évalué ces différents paramètres. Trois semaines après le transfert de microbiote, nous n'avons pas constaté d'augmentation de perméabilité intestinale et du LPS portal chez les souris ayant reçu « un microbiote obèse » comparativement aux souris gavées avec du PBS. De plus, l'expression des marqueurs de l'inflammation hépatique mesurés chez les souris ayant reçu « un microbiote obèse » n'ont pas été différents de ceux mesurés chez les souris contrôles. Par conséquent, la modification de la production hépatique de glucose ne semble pas dépendre d'une inflammation hépatique causée par le passage accru d'antigènes bactériens dans la circulation portale.

Par ailleurs, l'ensemble des travaux de T.K. Lam a clairement démontré un axe de communication entre l'intestin, le cerveau et le foie dans le contrôle de la production hépatique de glucose¹⁸⁹. En effet, les auteurs ont démontré que l'action intestinale de plusieurs composés comme le resveratrol ou la metformine pouvaient agir sur l'intestin pour diminuer la production hépatique de glucose^{157,269}. Dans le cadre de mes travaux de thèse, il est possible que le transfert d'un « microbiote obèse » puisse induire la production d'un composé bactérien capable d'agir sur l'axe intestin-cerveau-foie et ainsi de réguler la production hépatique de glucose. Cet axe a été mis en évidence récemment par les équipes de T.K. Lam et G. Mithieux qui ont montré que la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC) par le microbiote pouvait induire une diminution de la production hépatique de glucose en agissant *via* le cerveau^{187,188} (**cf Introduction III-B-2)-a.**). Il serait donc intéressant de doser les AGCC après le transfert de microbiote dans nos modèles. De plus, comme nous l'avons détaillé précédemment, nous avons constaté une forte augmentation du genre *Allobaculum* après le transfert caecal. Ce genre bactérien étant identifié comme un producteur de butyrate^{268,269}, son augmentation dans l'intestin des souris transplantées pourrait être associée avec l'augmentation de cet AGCC. Par ailleurs, transférer un « microbiote obèse » dans des souris ayant subi une vagotomie ou chez des souris traitées à la capsaïcine nous permettrait de conclure quant à l'implication de l'axe intestin-cerveau-foie dans le phénotype hépatique observé. La capsaïcine est une molécule extraite du piment capable, à forte dose, de détruire les terminaisons des afférences nerveuses (et donc vagales) et d'empêchant ainsi la communication entre l'intestin et le cerveau.

Une autre hypothèse quant au mode d'action du transfert de microbiote sur le métabolisme hépatique pourrait impliquer les acides biliaires. En effet, le cycle entéro-hépatique des acides biliaires peut être modulé par le microbiote intestinal. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le microbiote intestinal peut métaboliser les acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires et ainsi moduler leurs effets signalisant sur le foie. De plus, la transplantation fécale a été associée chez l'Homme à une modification du stock d'acides biliaires²³⁴. Il est donc possible que le transfert du « microbiote obèse » ait pu induire une modification du stock d'acides biliaires entraînant ainsi une modulation du métabolisme hépatique. Néanmoins, l'analyse microarray du foie des souris transplantées n'a pas fait ressortir de gènes significativement modulés et impliqués dans le cycle des acides biliaires.

Lors de ma thèse nous nous sommes focalisés sur les modifications taxonomiques et fonctionnelles du microbiote intestinal induites par le transplant pour tenter d'expliquer le phénotype métabolique observé. Cependant, il est possible que les effets métaboliques du transplant ne soit pas induit par des modifications du microbiote ou par des bactéries. En effet, lors du transfert de microbiote, les bactéries intestinales ne sont pas les seuls composants présents dans la suspension inoculée aux souris receveuses. La suspension étant à base de contenu caecal, elle contient également des virus, des champignons et beaucoup d'autres métabolites. Récemment, un article a montré que les virus présents dans l'intestin des souris (essentiellement des bactériophages) variaient en fonction de leur régime alimentaire (régime hyperlipidique ou régime normal). Nous pouvons donc penser que les virus présents dans la suspension de transplant issue de souris obèses étaient différents des virus contenus dans la suspension issue de souris minces²⁷⁰. De plus, une étude récente a montré chez l'homme qu'il était possible de transférer les virus contenus dans l'intestin d'un individu à un autre par transplantation fécale²⁴⁹. Les rôles des virus contenus dans le microbiote sur l'hôte sont encore flous mais il serait intéressant d'en étudier le rôle à l'avenir. Au-delà des virus, nous ne pouvons pas exclure un rôle éventuel des métabolites présents dans le transplant dans le phénotype observé. Néanmoins cette dernière hypothèse paraît peu probable au vu de la cinétique mise en place lors du protocole de transplantation. En effet, la suspension de transplant n'est administrée qu'à deux reprises et les analyses métaboliques sont effectuées trois semaines après le deuxième gavage. Dans ces conditions, il est difficile de concevoir que des composés inertes administrés seulement à 2 reprises puissent continuer à induire des effets trois semaines après la dernière administration. Cependant, pour écarter totalement cette hypothèse, il pourrait être envisagé de gaver aux souris receveuses la suspension de transplant dépourvue de bactéries vivantes (par chauffage ou filtration) afin de déterminer son effet sur le métabolisme.

V- Conclusion Générale

L'ensemble des expériences effectuées lors de ma thèse a montré d'une part, que la modification du microbiote intestinal de souris conventionnelles est possible par transfert caecal. D'autre part, cette modification peut influencer le devenir métabolique des souris ayant subi le transfert de microbiote. Contre toutes attentes, le transfert de ce « microbiote obèse », a induit une diminution de la glycémie à la fois sous régime normal et sous régime hyperlipidique. L'identification des acteurs bactériens impliqués dans ce phénomène ainsi que leurs fonctions seront extrêmement intéressantes afin de mieux cerner l'étiologie du diabète.

Longtemps ignoré, le microbiote intestinal est maintenant au cœur de nombreux projets de recherche. L'INSERM (Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale) l'a d'ailleurs placé au cœur d'un des trois grands programmes scientifiques transversaux dans le cadre du plan stratégique 2016-2020. La recherche sur le microbiote n'est qu'à ses balbutiements et j'espère que l'avenir nous dira tout ce dont il est capable...

Travaux personnels

Articles originaux

Blasco-Baque, V., Garidou, L., Pomie, C., Escoula, Q., Loubieres, P., Le Gall-David, S., Lemaitre, M., **Nicolas, S.**, Klopp, P., Waget, A., Azalbert, V., Colom, A., Bonnaure-Mallet, M., Kemoun, P., Serino, M. & Burcelin, R. (2016) Periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis drives periodontal microbiota dysbiosis and insulin resistance via an impaired adaptive immune response. *Gut*.

Pomie, C., Blasco-Baque, V., Klopp, P., **Nicolas, S.**, Waget, A., Loubieres, P., Azalbert, V., Puel, A., Lopez, F., Dray, C., Valet, P., Lelouvier, B., Servant, F., Courtney, M., Amar, J., Burcelin, R. & Garidou, L. (2016) Triggering the adaptive immune system with commensal gut bacteria protects against insulin resistance and dysglycemia. *Mol Metab*, **5** (6), 392-403.

Articles de revue

Nicolas, S. Impact du microbiote intestinal sur le développement des allergies (2016) *Revue Française d'Allergologie* Vol. 56, Issue 3, Pages 133-134.

Nicolas, S. Le microbiote intestinal : un organe à part entière (2016) *rubrique parlons sciences muséum de Toulouse*, <http://www.museum.toulouse.fr/-/le-microbiote-intestinal-un-organe-a-part-entiere>.

Serino, M., **Nicolas, S.**, Trabelsi, M. S., Burcelin, R. & Blasco-Baque, V. (2016) Young microbes for adult obesity. *Pediatr Obes*.

Serino, M., Blasco-Baque, V., **Nicolas, S.** & Burcelin, R. (2014a) Far from the eyes, close to the heart: dysbiosis of gut microbiota and cardiovascular consequences. *Curr Cardiol Rep*, **16** (11), 540.

Serino, M., Blasco-Baque, V., **Nicolas, S.** & Burcelin, R. (2014b) Managing the manager: gut microbes, stem cells and metabolism. *Diabetes Metab*, **40** (3), 186-190.

Communications orales

Nicolas, S. Impact du microbiote intestinal sur le développement des allergies. *Session plénière, Congrès Francophone d'Allergologie*. Paris, Avril 2016.

Serino M., **Nicolas S.**, ... , Burcelin R. La transplantation d'un microbiote intestinal issu de souris obèses protège contre les altérations métaboliques induites par un régime gras chez des souris non traitées aux antibiotiques *Diabetes & Metabolism* , Vol. 41, Sup. 1, Pages A18-A19 *Congrès de la Société Francophone du Diabète (SFD)* Bordeaux, Mars 2015.

Nicolas S. Qu'est-ce-que le microbiote intestinal? *Congrès de l'Association des Allergologues de la Région Toulousaine (AART)* Blagnac, Mars 2015.

Communications affichées

Nicolas S., ... , Serino M. Transplantation of dysbiotic gut microbiota decreases liver PEPCK and G6Pase activity and prevents HFD-induced dysmetabolism. *Keystone Symposia Gut microbiota, metabolic disorders and beyond (D4)* Newport (USA), April 2016

Annexes

Lors de ma thèse j'ai eu l'opportunité de participer à plusieurs travaux de recherche en collaboration avec d'autres membres de l'équipe. Deux de ces collaborations ont abouti à la publication de 2 articles scientifiques.

Le premier a été publié dans *Gut* et s'intitule « Periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* drives periodontal microbiota dysbiosis and insulin resistance via an impaired adaptive immune response. ». Ce travail a mis en évidence un lien de causalité entre les infections du parodonte (le tissu de soutien des dents) et le développement du diabète. Dans cette étude, l'infection buccale par *Porphyromonas gingivalis* (une bactérie capable d'induire une inflammation du parodonte) a exacerbé la résistance à l'insuline lors d'un régime hyperlipidique en induisant une forte inflammation locale et systémique.

Le deuxième article est intitulé: "Triggering the adaptive immune system with commensal gut bacteria protects against insulin resistance and dysglycemia." Et il a été publié dans la revue *Molecular Metabolism*. Dans cet article, nous avons montré que l'injection sous cutané d'un extrait de microbiote iléal pouvait prévenir le développement du diabète et de la résistance à l'insuline chez les souris traitées. Ces résultats laissent penser que l'immunisation d'une souris avec les antigènes contenus dans le microbiote intestinal de souris diabétiques peut prévenir le développement du diabète.

Lors de mes 3 années de doctorat j'ai également participé à l'écriture de 5 revues scientifiques dont 2 en premier auteur. La première revue publiée dans *Diabetes and Metabolism* a pour titre « Managing the manager: gut microbes, stem cells and metabolism. » Elle résume les travaux récents faisant le lien entre le microbiote intestinal et certains types de cellules souches (intestinales et immunitaires en particulier) dans le cadre de la régulation du métabolisme énergétique.

La deuxième revue publiée s'intéresse aux liens entre les modifications du microbiote intestinal et le développement des maladies cardiovasculaires, elle a pour titre « Far from the eyes, close to the heart: dysbiosis of gut microbiota and cardiovascular consequences. » et elle est parue dans *Current cardiology report*.

La troisième revue traite de l'influence de l'établissement du microbiote dans le développement des maladies métaboliques, elle est parue dans *Pediatric Obesity* et a pour titre « Young microbes for adult obesity ».

J'ai également eu la chance d'animer un stand bénévolement dans la cadre d'une journée d'animation scientifique portant sur le thème « Alimentation et cerveau ». A l'issue de cette journée, j'ai été invité à écrire un article de vulgarisation scientifique sur le site du musée intitulé, « Le microbiote intestinal, un organe à part entière ».

Enfin, j'ai écrit pour la revue française d'allergologie une revue portant sur l'impact du microbiote intestinal sur le développement des allergies.

Références

1. Knoll, A.H. & Barghoorn, E.S. Archean microfossils showing cell division from the swaziland system of South Africa. *Science* **198**, 396-398 (1977).
2. Sommer, F. & Backhed, F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nature reviews. Microbiology* **11**, 227-238 (2013).
3. Arumugam, M., *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**, 174-180 (2011).
4. Qin, J., *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59-65 (2010).
5. Wang, D.Q. & Carey, M.C. Therapeutic uses of animal biles in traditional Chinese medicine: an ethnopharmacological, biophysical chemical and medicinal review. *World journal of gastroenterology : WJG* **20**, 9952-9975 (2014).
6. Lefebvre, P., Cariou, B., Lien, F., Kuipers, F. & Staels, B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiological reviews* **89**, 147-191 (2009).
7. Li, H., *et al.* The outer mucus layer hosts a distinct intestinal microbial niche. *Nature communications* **6**, 8292 (2015).
8. Sartor, R.B. Gut microbiota: Optimal sampling of the intestinal microbiota for research. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **12**, 253-254 (2015).
9. Serino, M., Chabo, C. & Burcelin, R. Intestinal MicrobiOMICS to define health and disease in human and mice. *Current pharmaceutical biotechnology* **13**, 746-758 (2012).
10. Li, J., *et al.* An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nature biotechnology* **32**, 834-841 (2014).
11. Xiao, L., *et al.* A catalog of the mouse gut metagenome. *Nature biotechnology* **33**, 1103-1108 (2015).
12. Langille, M.G., *et al.* Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature biotechnology* **31**, 814-821 (2013).
13. Bashiardes, S., Zilberman-Schapira, G. & Elinav, E. Use of Metatranscriptomics in Microbiome Research. *Bioinformatics and biology insights* **10**, 19-25 (2016).
14. Korem, T., *et al.* Growth dynamics of gut microbiota in health and disease inferred from single metagenomic samples. *Science* **349**, 1101-1106 (2015).
15. DiGiulio, D.B., *et al.* Prevalence and diversity of microbes in the amniotic fluid, the fetal inflammatory response, and pregnancy outcome in women with preterm pre-labor rupture of membranes. *American journal of reproductive immunology* **64**, 38-57 (2010).
16. DiGiulio, D.B., *et al.* Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PloS one* **3**, e3056 (2008).
17. Aagaard, K., *et al.* The placenta harbors a unique microbiome. *Science translational medicine* **6**, 237ra265 (2014).
18. Serino, M., Nicolas, S., Trabelsi, M.S., Burcelin, R. & Blasco-Baque, V. Young microbes for adult obesity. *Pediatric obesity* (2016).
19. Dominguez-Bello, M.G., *et al.* Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 11971-11975 (2010).
20. Backhed, F., *et al.* Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell host & microbe* **17**, 852 (2015).
21. Jakobsson, H.E., *et al.* Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut* **63**, 559-566 (2014).
22. Dominguez-Bello, M.G., *et al.* Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nature medicine* (2016).
23. Turnbaugh, P.J., *et al.* A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* **457**, 480-484 (2009).
24. Ridaura, V.K., *et al.* Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* **341**, 1241214 (2013).
25. Daft, J.G., Ptacek, T., Kumar, R., Morrow, C. & Lorenz, R.G. Cross-fostering immediately after birth induces a permanent microbiota shift that is shaped by the nursing mother. *Microbiome* **3**, 17 (2015).
26. Yatsunenkov, T., *et al.* Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**, 222-227 (2012).
27. Ege, M.J., *et al.* Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *The New England journal of medicine* **364**, 701-709 (2011).
28. Ubeda, C., *et al.* Familial transmission rather than defective innate immunity shapes the distinct intestinal microbiota of TLR-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* **209**, 1445-1456 (2012).
29. Vijay-Kumar, M., *et al.* Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science* **328**, 228-231 (2010).
30. Zhang, W., *et al.* Deletion of the Toll-Like Receptor 5 Gene Per Se Does Not Determine the Gut Microbiome Profile That Induces Metabolic Syndrome: Environment Trumps Genotype. *PloS one* **11**, e0150943 (2016).
31. Smilowitz, J.T., Lebrilla, C.B., Mills, D.A., German, J.B. & Freeman, S.L. Breast milk oligosaccharides: structure-function relationships in the neonate. *Annual review of nutrition* **34**, 143-169 (2014).
32. Coppa, G.V., *et al.* Oligosaccharides in 4 different milk groups, Bifidobacteria, and Ruminococcus obeum. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **53**, 80-87 (2011).

33. Engfer, M.B., Stahl, B., Finke, B., Sawatzki, G. & Daniel, H. Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *The American journal of clinical nutrition* **71**, 1589-1596 (2000).
34. Katayama, T. Host-derived glycans serve as selected nutrients for the gut microbe: human milk oligosaccharides and bifidobacteria. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1-12 (2016).
35. Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C. & Chassard, C. Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. *Nutrition reviews* **73**, 426-437 (2015).
36. Charbonneau, M.R., *et al.* Sialylated Milk Oligosaccharides Promote Microbiota-Dependent Growth in Models of Infant Undernutrition. *Cell* **164**, 859-871 (2016).
37. Stark, P.L. & Lee, A. The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *Journal of medical microbiology* **15**, 189-203 (1982).
38. Yoshioka, H., Iseki, K. & Fujita, K. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics* **72**, 317-321 (1983).
39. Veereman-Wauters, G., *et al.* Physiological and bifidogenic effects of prebiotic supplements in infant formulae. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **52**, 763-771 (2011).
40. Ward, R.E., Ninonuevo, M., Mills, D.A., Lebrilla, C.B. & German, J.B. In vitro fermentability of human milk oligosaccharides by several strains of bifidobacteria. *Molecular nutrition & food research* **51**, 1398-1405 (2007).
41. Tanabe, S., Kinuta, Y. & Saito, Y. Bifidobacterium infantis suppresses proinflammatory interleukin-17 production in murine splenocytes and dextran sodium sulfate-induced intestinal inflammation. *International journal of molecular medicine* **22**, 181-185 (2008).
42. Preising, J., *et al.* Selection of bifidobacteria based on adhesion and anti-inflammatory capacity in vitro for amelioration of murine colitis. *Applied and environmental microbiology* **76**, 3048-3051 (2010).
43. Chichlowski, M., De Lartigue, G., German, J.B., Raybould, H.E. & Mills, D.A. Bifidobacteria isolated from infants and cultured on human milk oligosaccharides affect intestinal epithelial function. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **55**, 321-327 (2012).
44. Ewaschuk, J.B., *et al.* Secreted bioactive factors from Bifidobacterium infantis enhance epithelial cell barrier function. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **295**, G1025-1034 (2008).
45. Koenig, J.E., *et al.* Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108 Suppl 1**, 4578-4585 (2011).
46. Ley, R.E., *et al.* Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* **320**, 1647-1651 (2008).
47. Muegge, B.D., *et al.* Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science* **332**, 970-974 (2011).
48. Brinkworth, G.D., Noakes, M., Clifton, P.M. & Bird, A.R. Comparative effects of very low-carbohydrate, high-fat and high-carbohydrate, low-fat weight-loss diets on bowel habit and faecal short-chain fatty acids and bacterial populations. *The British journal of nutrition* **101**, 1493-1502 (2009).
49. Duncan, S.H., *et al.* Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Applied and environmental microbiology* **73**, 1073-1078 (2007).
50. Walker, A.W., *et al.* Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *The ISME journal* **5**, 220-230 (2011).
51. Turnbaugh, P.J., *et al.* The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science translational medicine* **1**, 6ra14 (2009).
52. Carmody, R.N., *et al.* Diet dominates host genotype in shaping the murine gut microbiota. *Cell host & microbe* **17**, 72-84 (2015).
53. David, L.A., *et al.* Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* **505**, 559-563 (2014).
54. Martens, E.C., *et al.* Recognition and degradation of plant cell wall polysaccharides by two human gut symbionts. *PLoS biology* **9**, e1001221 (2011).
55. El Kaoutari, A., Armougom, F., Gordon, J.I., Raoult, D. & Henrissat, B. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nature reviews. Microbiology* **11**, 497-504 (2013).
56. Flint, H.J., Scott, K.P., Duncan, S.H., Louis, P. & Forano, E. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut microbes* **3**, 289-306 (2012).
57. Sonnenburg, E.D. & Sonnenburg, J.L. Starving our microbial self: the deleterious consequences of a diet deficient in microbiota-accessible carbohydrates. *Cell metabolism* **20**, 779-786 (2014).
58. Cotillard, A., *et al.* Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* **500**, 585-588 (2013).
59. Trompette, A., *et al.* Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nature medicine* **20**, 159-166 (2014).
60. Sonnenburg, E.D., *et al.* Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature* **529**, 212-215 (2016).
61. Wu, G.D., *et al.* Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* **334**, 105-108 (2011).
62. De Filippo, C., *et al.* Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 14691-14696 (2010).
63. Macpherson, A.J. & Harris, N.L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature reviews. Immunology* **4**, 478-485 (2004).
64. Bercik, P., *et al.* The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotrophic factor and behavior in mice. *Gastroenterology* **141**, 599-609, 609 e591-593 (2011).

65. Roland, B.C., *et al.* Small Intestinal Transit Time Is Delayed in Small Intestinal Bacterial Overgrowth. *Journal of clinical gastroenterology* **49**, 571-576 (2015).
66. Kaur, J., *et al.* Prolonged orocecal transit time enhances serum bile acids through bacterial overgrowth, contributing factor to gallstone disease. *Journal of clinical gastroenterology* **48**, 365-369 (2014).
67. Ferolla, S.M., Armiliato, G.N., Couto, C.A. & Ferrari, T.C. The role of intestinal bacteria overgrowth in obesity-related nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrients* **6**, 5583-5599 (2014).
68. Kashyap, P.C., *et al.* Complex interactions among diet, gastrointestinal transit, and gut microbiota in humanized mice. *Gastroenterology* **144**, 967-977 (2013).
69. Wichmann, A., *et al.* Microbial modulation of energy availability in the colon regulates intestinal transit. *Cell host & microbe* **14**, 582-590 (2013).
70. Dey, N., *et al.* Regulators of gut motility revealed by a gnotobiotic model of diet-microbiome interactions related to travel. *Cell* **163**, 95-107 (2015).
71. Johansson, M.E., *et al.* The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 15064-15069 (2008).
72. Fu, J., *et al.* Loss of intestinal core 1-derived O-glycans causes spontaneous colitis in mice. *The Journal of clinical investigation* **121**, 1657-1666 (2011).
73. Johansson, M.E., *et al.* Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model. *PloS one* **5**, e12238 (2010).
74. Johansson, M.E., *et al.* Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut* **63**, 281-291 (2014).
75. Johansson, M.E., Sjövall, H. & Hansson, G.C. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **10**, 352-361 (2013).
76. Jakobsson, H.E., *et al.* The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO reports* **16**, 164-177 (2015).
77. Turner, J.R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature reviews. Immunology* **9**, 799-809 (2009).
78. Braniste, V., *et al.* Oestradiol decreases colonic permeability through oestrogen receptor beta-mediated up-regulation of occludin and junctional adhesion molecule-A in epithelial cells. *The Journal of physiology* **587**, 3317-3328 (2009).
79. Okumura, R., *et al.* Lypd8 promotes the segregation of flagellated microbiota and colonic epithelia. *Nature* (2016).
80. Donohoe, D.R., *et al.* The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell metabolism* **13**, 517-526 (2011).
81. El Aidy, S., *et al.* Gut bacteria-host metabolic interplay during conventionalisation of the mouse germfree colon. *The ISME journal* **7**, 743-755 (2013).
82. El Aidy, S., *et al.* The gut microbiota elicits a profound metabolic reorientation in the mouse jejunal mucosa during conventionalisation. *Gut* **62**, 1306-1314 (2013).
83. Suzuki, T., Yoshida, S. & Hara, H. Physiological concentrations of short-chain fatty acids immediately suppress colonic epithelial permeability. *The British journal of nutrition* **100**, 297-305 (2008).
84. Venkatesh, M., *et al.* Symbiotic bacterial metabolites regulate gastrointestinal barrier function via the xenobiotic sensor PXR and Toll-like receptor 4. *Immunity* **41**, 296-310 (2014).
85. Guo, S., Al-Sadi, R., Said, H.M. & Ma, T.Y. Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability in vitro and in vivo by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14. *The American journal of pathology* **182**, 375-387 (2013).
86. Guo, S., *et al.* Lipopolysaccharide Regulation of Intestinal Tight Junction Permeability Is Mediated by TLR4 Signal Transduction Pathway Activation of FAK and MyD88. *Journal of immunology* **195**, 4999-5010 (2015).
87. Mowat, A.M. & Agace, W.W. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature reviews. Immunology* **14**, 667-685 (2014).
88. Shinkai, Y., *et al.* RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* **68**, 855-867 (1992).
89. Mombaerts, P., *et al.* RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* **68**, 869-877 (1992).
90. Garrett, W.S., *et al.* Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. *Cell* **131**, 33-45 (2007).
91. Garrett, W.S., *et al.* Enterobacteriaceae act in concert with the gut microbiota to induce spontaneous and maternally transmitted colitis. *Cell host & microbe* **8**, 292-300 (2010).
92. Maynard, C.L., Elson, C.O., Hatton, R.D. & Weaver, C.T. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* **489**, 231-241 (2012).
93. Izcue, A., Coombes, J.L. & Powrie, F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annual review of immunology* **27**, 313-338 (2009).
94. Cong, Y., Feng, T., Fujihashi, K., Schoeb, T.R. & Elson, C.O. A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 19256-19261 (2009).
95. Ivanov, I.I., *et al.* Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* **139**, 485-498 (2009).
96. Atarashi, K., *et al.* Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell* **163**, 367-380 (2015).
97. Atarashi, K., *et al.* Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* **500**, 232-236 (2013).

98. Smith, P.M., *et al.* The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* **341**, 569-573 (2013).
99. Zlydaszyk, J.C. & Moon, R.J. Fate of ⁵¹Cr-labeled lipopolysaccharide in tissue culture cells and livers of normal mice. *Infection and immunity* **14**, 100-105 (1976).
100. Shao, B., *et al.* A host lipase detoxifies bacterial lipopolysaccharides in the liver and spleen. *The Journal of biological chemistry* **282**, 13726-13735 (2007).
101. Fox, E.S., Thomas, P. & Broitman, S.A. Clearance of gut-derived endotoxins by the liver. Release and modification of ³H, ¹⁴C-lipopolysaccharide by isolated rat Kupffer cells. *Gastroenterology* **96**, 456-461 (1989).
102. Treon, S.P., Thomas, P. & Broitman, S.A. Lipopolysaccharide (LPS) processing by Kupffer cells releases a modified LPS with increased hepatocyte binding and decreased tumor necrosis factor- α stimulatory capacity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* **202**, 153-158 (1993).
103. Mimura, Y., Sakisaka, S., Harada, M., Sata, M. & Tanikawa, K. Role of hepatocytes in direct clearance of lipopolysaccharide in rats. *Gastroenterology* **109**, 1969-1976 (1995).
104. Balmer, M.L., *et al.* The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota. *Science translational medicine* **6**, 237ra266 (2014).
105. Miele, L., *et al.* Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **49**, 1877-1887 (2009).
106. Rahman, K., *et al.* Loss of Junctional Adhesion Molecule A Promotes Severe Steatohepatitis in Mice on a Diet High in Saturated Fat, Fructose, and Cholesterol. *Gastroenterology* (2016).
107. Le Roy, T., *et al.* Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut* **62**, 1787-1794 (2013).
108. Yoshimoto, S., *et al.* Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature* **499**, 97-101 (2013).
109. Nie, Y.F., Hu, J. & Yan, X.H. Cross-talk between bile acids and intestinal microbiota in host metabolism and health. *Journal of Zhejiang University. Science. B* **16**, 436-446 (2015).
110. Sayin, S.I., *et al.* Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell metabolism* **17**, 225-235 (2013).
111. Stumpel, F., Burcelin, R., Jungermann, K. & Thorens, B. Normal kinetics of intestinal glucose absorption in the absence of GLUT2: evidence for a transport pathway requiring glucose phosphorylation and transfer into the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 11330-11335 (2001).
112. Naftalin, R.J. Does apical membrane GLUT2 have a role in intestinal glucose uptake? *F1000Research* **3**, 304 (2014).
113. Burcelin, R., Da Costa, A., Drucker, D. & Thorens, B. Glucose competence of the hepatoportal vein sensor requires the presence of an activated glucagon-like peptide-1 receptor. *Diabetes* **50**, 1720-1728 (2001).
114. Wang, P.Y., *et al.* Upper intestinal lipids trigger a gut-brain-liver axis to regulate glucose production. *Nature* **452**, 1012-1016 (2008).
115. Rasmussen, B.A., *et al.* Duodenal activation of cAMP-dependent protein kinase induces vagal afferent firing and lowers glucose production in rats. *Gastroenterology* **142**, 834-843 e833 (2012).
116. Cheung, G.W., Kokorovic, A., Lam, C.K., Chari, M. & Lam, T.K. Intestinal cholecystokinin controls glucose production through a neuronal network. *Cell metabolism* **10**, 99-109 (2009).
117. Humphrey, C.S., Dykes, J.R. & Johnston, D. Effects of truncal, selective, and highly selective vagotomy on glucose tolerance and insulin secretion in patients with duodenal ulcer. Part II-Comparison of response to oral and intravenous glucose. *British medical journal* **2**, 114-116 (1975).
118. Karnieli, E., *et al.* Insulin-stimulated translocation of glucose transport systems in the isolated rat adipose cell. Time course, reversal, insulin concentration dependency, and relationship to glucose transport activity. *The Journal of biological chemistry* **256**, 4772-4777 (1981).
119. Mithieux, G., Gautier-Stein, A., Rajas, F. & Zitoun, C. Contribution of intestine and kidney to glucose fluxes in different nutritional states in rat. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* **143**, 195-200 (2006).
120. Girard, J. Gluconeogenesis in late fetal and early neonatal life. *Biology of the neonate* **50**, 237-258 (1986).
121. She, P., *et al.* Phosphoenolpyruvate carboxykinase is necessary for the integration of hepatic energy metabolism. *Molecular and cellular biology* **20**, 6508-6517 (2000).
122. Lei, K.J., *et al.* Glucose-6-phosphatase dependent substrate transport in the glycogen storage disease type-1a mouse. *Nature genetics* **13**, 203-209 (1996).
123. Bougneres, P.F., *et al.* Fasting hypoglycemia resulting from hepatic carnitine palmitoyl transferase deficiency. *The Journal of pediatrics* **98**, 742-746 (1981).
124. Matsumoto, M., Pocai, A., Rossetti, L., Depinho, R.A. & Accili, D. Impaired regulation of hepatic glucose production in mice lacking the forkhead transcription factor Foxo1 in liver. *Cell metabolism* **6**, 208-216 (2007).
125. Lu, M., *et al.* Insulin regulates liver metabolism in vivo in the absence of hepatic Akt and Foxo1. *Nature medicine* **18**, 388-395 (2012).
126. Titchenell, P.M., Chu, Q., Monks, B.R. & Birnbaum, M.J. Hepatic insulin signalling is dispensable for suppression of glucose output by insulin in vivo. *Nature communications* **6**, 7078 (2015).
127. I, O.S., *et al.* FoxO1 integrates direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production and glucose utilization. *Nature communications* **6**, 7079 (2015).

128. Lewis, G.F., Vranic, M., Harley, P. & Giacca, A. Fatty acids mediate the acute extrahepatic effects of insulin on hepatic glucose production in humans. *Diabetes* **46**, 1111-1119 (1997).
129. Obici, S., Zhang, B.B., Karkanias, G. & Rossetti, L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nature medicine* **8**, 1376-1382 (2002).
130. Gelling, R.W., *et al.* Insulin action in the brain contributes to glucose lowering during insulin treatment of diabetes. *Cell metabolism* **3**, 67-73 (2006).
131. Konner, A.C., *et al.* Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell metabolism* **5**, 438-449 (2007).
132. Pocai, A., *et al.* Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature* **434**, 1026-1031 (2005).
133. Inoue, H., *et al.* Role of hepatic STAT3 in brain-insulin action on hepatic glucose production. *Cell metabolism* **3**, 267-275 (2006).
134. Hancock, A.S., Du, A., Liu, J., Miller, M. & May, C.L. Glucagon deficiency reduces hepatic glucose production and improves glucose tolerance in adult mice. *Molecular endocrinology* **24**, 1605-1614 (2010).
135. Jiang, G. & Zhang, B.B. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **284**, E671-678 (2003).
136. Ozcan, L., *et al.* Calcium signaling through CaMKII regulates hepatic glucose production in fasting and obesity. *Cell metabolism* **15**, 739-751 (2012).
137. Inokuchi, A., Oomura, Y., Shimizu, N. & Yamamoto, T. Central action of glucagon in rat hypothalamus. *The American journal of physiology* **250**, R120-126 (1986).
138. Amir, S. Central glucagon-induced hyperglycemia is mediated by combined activation of the adrenal medulla and sympathetic nerve endings. *Physiology & behavior* **37**, 563-566 (1986).
139. Mighiu, P.I., *et al.* Hypothalamic glucagon signaling inhibits hepatic glucose production. *Nature medicine* **19**, 766-772 (2013).
140. Opherck, C., *et al.* Inactivation of the glucocorticoid receptor in hepatocytes leads to fasting hypoglycemia and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Molecular endocrinology* **18**, 1346-1353 (2004).
141. Reilly, S.M., *et al.* A subcutaneous adipose tissue-liver signalling axis controls hepatic gluconeogenesis. *Nature communications* **6**, 6047 (2015).
142. Fang, S., *et al.* Intestinal FXR agonism promotes adipose tissue browning and reduces obesity and insulin resistance. *Nature medicine* **21**, 159-165 (2015).
143. Inagaki, T., *et al.* Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell metabolism* **2**, 217-225 (2005).
144. Potthoff, M.J., *et al.* FGF15/19 regulates hepatic glucose metabolism by inhibiting the CREB-PGC-1 α pathway. *Cell metabolism* **13**, 729-738 (2011).
145. Sumara, G., Sumara, O., Kim, J.K. & Karsenty, G. Gut-derived serotonin is a multifunctional determinant to fasting adaptation. *Cell metabolism* **16**, 588-600 (2012).
146. Kahn, S.E., Cooper, M.E. & Del Prato, S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet* **383**, 1068-1083 (2014).
147. Hu, F.B., van Dam, R.M. & Liu, S. Diet and risk of Type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate. *Diabetologia* **44**, 805-817 (2001).
148. Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S. & Spiegelman, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259**, 87-91 (1993).
149. Patsouris, D., *et al.* Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell metabolism* **8**, 301-309 (2008).
150. Magnusson, I., Rothman, D.L., Katz, L.D., Shulman, R.G. & Shulman, G.I. Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A ^{13}C nuclear magnetic resonance study. *The Journal of clinical investigation* **90**, 1323-1327 (1992).
151. Stumvoll, M., Nurjhan, N., Perriello, G., Dailey, G. & Gerich, J.E. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England journal of medicine* **333**, 550-554 (1995).
152. Zhou, G., *et al.* Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *The Journal of clinical investigation* **108**, 1167-1174 (2001).
153. Shaw, R.J., *et al.* The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* **310**, 1642-1646 (2005).
154. Foretz, M., *et al.* Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *The Journal of clinical investigation* **120**, 2355-2369 (2010).
155. Miller, R.A., *et al.* Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature* **494**, 256-260 (2013).
156. Madiraju, A.K., *et al.* Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature* **510**, 542-546 (2014).
157. Duca, F.A., *et al.* Metformin activates a duodenal Ampk-dependent pathway to lower hepatic glucose production in rats. *Nature medicine* **21**, 506-511 (2015).
158. Shin, N.R., *et al.* An increase in the Akkermansia spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut* **63**, 727-735 (2014).
159. Napolitano, A., *et al.* Novel gut-based pharmacology of metformin in patients with type 2 diabetes mellitus. *PloS one* **9**, e100778 (2014).

160. Forslund, K., *et al.* Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature* **528**, 262-266 (2015).
161. Ley, R.E., *et al.* Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 11070-11075 (2005).
162. Turnbaugh, P.J., *et al.* An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**, 1027-1031 (2006).
163. Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S. & Gordon, J.I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**, 1022-1023 (2006).
164. Turnbaugh, P.J., Backhed, F., Fulton, L. & Gordon, J.I. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell host & microbe* **3**, 213-223 (2008).
165. Le Chatelier, E., *et al.* Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* **500**, 541-546 (2013).
166. Duncan, S.H., *et al.* Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *International journal of obesity* **32**, 1720-1724 (2008).
167. Schwartz, A., *et al.* Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity* **18**, 190-195 (2010).
168. Murphy, E.F., *et al.* Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. *Gut* **59**, 1635-1642 (2010).
169. Rajala, M.W., *et al.* Leptin acts independently of food intake to modulate gut microbial composition in male mice. *Endocrinology* **155**, 748-757 (2014).
170. Geurts, L., *et al.* Altered gut microbiota and endocannabinoid system tone in obese and diabetic leptin-resistant mice: impact on apelin regulation in adipose tissue. *Frontiers in microbiology* **2**, 149 (2011).
171. Lees, H., *et al.* Age and microenvironment outweigh genetic influence on the Zucker rat microbiome. *PloS one* **9**, e100916 (2014).
172. Qin, J., *et al.* A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* **490**, 55-60 (2012).
173. Karlsson, F.H., *et al.* Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* **498**, 99-103 (2013).
174. Reyniers, J.A., Trexler, P.C. & Ervin, R.F. Rearing germ-free albino rats. *Lobund reports*, 1-84 (1946).
175. Reyniers, J.A., Trexler, P.C. & *et al.* A complete life-cycle in the germ-free bantam chicken. *Nature* **162**, 67 (1948).
176. Dubos, R.J. & Schaedler, R.W. The effect of the intestinal flora on the growth rate of mice, and on their susceptibility to experimental infections. *The Journal of experimental medicine* **111**, 407-417 (1960).
177. Wostmann, B.S. The germfree animal in nutritional studies. *Annual review of nutrition* **1**, 257-279 (1981).
178. Wostmann, B.S., Larkin, C., Moriarty, A. & Bruckner-Kardoss, E. Dietary intake, energy metabolism, and excretory losses of adult male germfree Wistar rats. *Laboratory animal science* **33**, 46-50 (1983).
179. Backhed, F., *et al.* The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 15718-15723 (2004).
180. Backhed, F., Manchester, J.K., Semenkovich, C.F. & Gordon, J.I. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 979-984 (2007).
181. Rabot, S., *et al.* Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **24**, 4948-4959 (2010).
182. Xu, J., *et al.* A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis. *Science* **299**, 2074-2076 (2003).
183. Scott, K.P., Gratz, S.W., Sheridan, P.O., Flint, H.J. & Duncan, S.H. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* **69**, 52-60 (2013).
184. Bergman, E.N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological reviews* **70**, 567-590 (1990).
185. Tolhurst, G., *et al.* Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes* **61**, 364-371 (2012).
186. Psichas, A., *et al.* The short chain fatty acid propionate stimulates GLP-1 and PYY secretion via free fatty acid receptor 2 in rodents. *International journal of obesity* **39**, 424-429 (2015).
187. Zadeh-Tahmasebi, M., *et al.* Activation of short and long chain fatty acid sensing machinery in the ileum lowers glucose production in vivo. *The Journal of biological chemistry* (2016).
188. De Vadder, F., *et al.* Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell* **156**, 84-96 (2014).
189. Duca, F.A., Bauer, P.V., Hamr, S.C. & Lam, T.K. Glucoregulatory Relevance of Small Intestinal Nutrient Sensing in Physiology, Bariatric Surgery, and Pharmacology. *Cell metabolism* **22**, 367-380 (2015).
190. Wang, Z., *et al.* Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* **472**, 57-63 (2011).
191. Tang, W.H., *et al.* Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *The New England journal of medicine* **368**, 1575-1584 (2013).
192. Koeth, R.A., *et al.* Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature medicine* **19**, 576-585 (2013).
193. Wang, Z., *et al.* Non-lethal Inhibition of Gut Microbial Trimethylamine Production for the Treatment of Atherosclerosis. *Cell* **163**, 1585-1595 (2015).

194. Suez, J., *et al.* Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature* **514**, 181-186 (2014).
195. Breton, J., *et al.* Gut Commensal *E. coli* Proteins Activate Host Satiety Pathways following Nutrient-Induced Bacterial Growth. *Cell metabolism* **23**, 324-334 (2016).
196. Thomas, C., *et al.* TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell metabolism* **10**, 167-177 (2009).
197. Trabelsi, M.S., *et al.* Farnesoid X receptor inhibits glucagon-like peptide-1 production by enteroendocrine L cells. *Nature communications* **6**, 7629 (2015).
198. Porez, G., Prawitt, J., Gross, B. & Staels, B. Bile acid receptors as targets for the treatment of dyslipidemia and cardiovascular disease. *Journal of lipid research* **53**, 1723-1737 (2012).
199. Li, F., *et al.* Microbiome remodelling leads to inhibition of intestinal farnesoid X receptor signalling and decreased obesity. *Nature communications* **4**, 2384 (2013).
200. Everard, A., *et al.* Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 9066-9071 (2013).
201. Cani, P.D., *et al.* Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* **57**, 1470-1481 (2008).
202. de La Serre, C.B., *et al.* Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **299**, G440-448 (2010).
203. Brun, P., *et al.* Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **292**, G518-525 (2007).
204. Cani, P.D., *et al.* Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* **58**, 1091-1103 (2009).
205. Amar, J., *et al.* Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO molecular medicine* **3**, 559-572 (2011).
206. Serino, M., *et al.* Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. *Gut* **61**, 543-553 (2012).
207. Michielan, A. & D'Inca, R. Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut. *Mediators of inflammation* **2015**, 628157 (2015).
208. Marchiando, A.M., *et al.* Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo. *The Journal of cell biology* **189**, 111-126 (2010).
209. Al-Sadi, R.M. & Ma, T.Y. IL-1 β causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *Journal of immunology* **178**, 4641-4649 (2007).
210. Luck, H., *et al.* Regulation of obesity-related insulin resistance with gut anti-inflammatory agents. *Cell metabolism* **21**, 527-542 (2015).
211. Ding, S., *et al.* High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. *PloS one* **5**, e12191 (2010).
212. Monteiro-Sepulveda, M., *et al.* Jejunal T Cell Inflammation in Human Obesity Correlates with Decreased Enterocyte Insulin Signaling. *Cell metabolism* **22**, 113-124 (2015).
213. Johnson, A.M., *et al.* High fat diet causes depletion of intestinal eosinophils associated with intestinal permeability. *PloS one* **10**, e0122195 (2015).
214. Garidou, L., *et al.* The Gut Microbiota Regulates Intestinal CD4 T Cells Expressing ROR γ and Controls Metabolic Disease. *Cell metabolism* **22**, 100-112 (2015).
215. Cavallari, J.F., Denou, E., Foley, K.P., Khan, W.I. & Schertzer, J.D. Different Th17 immunity in gut, liver, and adipose tissues during obesity: the role of diet, genetics, and microbes. *Gut microbes* **7**, 82-89 (2016).
216. Cani, P.D., *et al.* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* **56**, 1761-1772 (2007).
217. Amar, J., *et al.* Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *The American journal of clinical nutrition* **87**, 1219-1223 (2008).
218. Amar, J., *et al.* Involvement of tissue bacteria in the onset of diabetes in humans: evidence for a concept. *Diabetologia* **54**, 3055-3061 (2011).
219. Schertzer, J.D., *et al.* NOD1 activators link innate immunity to insulin resistance. *Diabetes* **60**, 2206-2215 (2011).
220. Lee, H.Y., *et al.* Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice. *Biochimica et biophysica acta* **1761**, 736-744 (2006).
221. Wang, J., *et al.* Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *The ISME journal* **9**, 1-15 (2015).
222. Andreasen, A.S., *et al.* Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *The British journal of nutrition* **104**, 1831-1838 (2010).
223. Firouzi, S., Majid, H.A., Ismail, A., Kamaruddin, N.A. & Barakatun-Nisak, M.Y. Effect of multi-strain probiotics (multi-strain microbial cell preparation) on glycemic control and other diabetes-related outcomes in people with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *European journal of nutrition* (2016).
224. Yoo, J.Y. & Kim, S.S. Probiotics and Prebiotics: Present Status and Future Perspectives on Metabolic Disorders. *Nutrients* **8**(2016).
225. DePeters, E.J. & George, L.W. Rumen transfaunation. *Immunology letters* **162**, 69-76 (2014).
226. Zhang, F., Luo, W., Shi, Y., Fan, Z. & Ji, G. Should we standardize the 1,700-year-old fecal microbiota transplantation? *The American journal of gastroenterology* **107**, 1755; author reply p 1755-1756 (2012).

227. Damman, C.J., Miller, S.I., Surawicz, C.M. & Zisman, T.L. The microbiome and inflammatory bowel disease: is there a therapeutic role for fecal microbiota transplantation? *The American journal of gastroenterology* **107**, 1452-1459 (2012).
228. Eiseman, B., Silen, W., Bascom, G.S. & Kauvar, A.J. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery* **44**, 854-859 (1958).
229. Bowden, T.A., Jr., Mansberger, A.R., Jr. & Lykins, L.E. Pseudomembranous enterocolitis: mechanism for restoring floral homeostasis. *The American surgeon* **47**, 178-183 (1981).
230. Schwan, A., Sjolín, S., Trottestam, U. & Aronsson, B. Relapsing clostridium difficile enterocolitis cured by rectal infusion of homologous faeces. *Lancet* **2**, 845 (1983).
231. Bennet, J.D. & Brinkman, M. Treatment of ulcerative colitis by implantation of normal colonic flora. *Lancet* **1**, 164 (1989).
232. van Nood, E., *et al.* Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *The New England journal of medicine* **368**, 407-415 (2013).
233. Buffie, C.G., *et al.* Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature* **517**, 205-208 (2015).
234. Weingarden, A.R., *et al.* Changes in Colonic Bile Acid Composition following Fecal Microbiota Transplantation Are Sufficient to Control *Clostridium difficile* Germination and Growth. *PloS one* **11**, e0147210 (2016).
235. Moayyedi, P., *et al.* Fecal Microbiota Transplantation Induces Remission in Patients With Active Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology* **149**, 102-109 e106 (2015).
236. Rossen, N.G., *et al.* Findings From a Randomized Controlled Trial of Fecal Transplantation for Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* **149**, 110-118 e114 (2015).
237. Kelly, C.R., *et al.* Update on Fecal Microbiota Transplantation 2015: Indications, Methodologies, Mechanisms, and Outlook. *Gastroenterology* **149**, 223-237 (2015).
238. Choi, H.H. & Cho, Y.S. Fecal Microbiota Transplantation: Current Applications, Effectiveness, and Future Perspectives. *Clinical endoscopy* (2016).
239. Youngster, I., *et al.* Fecal microbiota transplant for relapsing *Clostridium difficile* infection using a frozen inoculum from unrelated donors: a randomized, open-label, controlled pilot study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **58**, 1515-1522 (2014).
240. Youngster, I., *et al.* Oral, capsulized, frozen fecal microbiota transplantation for relapsing *Clostridium difficile* infection. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **312**, 1772-1778 (2014).
241. Vrieze, A., *et al.* Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology* **143**, 913-916 e917 (2012).
242. Elinav, E., *et al.* NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* **145**, 745-757 (2011).
243. Henao-Mejia, J., *et al.* Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* **482**, 179-185 (2012).
244. Schulz, M.D., *et al.* High-fat-diet-mediated dysbiosis promotes intestinal carcinogenesis independently of obesity. *Nature* **514**, 508-512 (2014).
245. Benakis, C., *et al.* Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal gammadelta T cells. *Nature medicine* (2016).
246. Manichanh, C., *et al.* Reshaping the gut microbiome with bacterial transplantation and antibiotic intake. *Genome research* **20**, 1411-1419 (2010).
247. Ji, Y., *et al.* Diet-induced alterations in gut microflora contribute to lethal pulmonary damage in TLR2/TLR4-deficient mice. *Cell reports* **8**, 137-149 (2014).
248. Li, S.S., *et al.* Durable coexistence of donor and recipient strains after fecal microbiota transplantation. *Science* **352**, 586-589 (2016).
249. Chehoud, C., *et al.* Transfer of Viral Communities between Human Individuals during Fecal Microbiota Transplantation. *mBio* **7**(2016).
250. Rajas, F., Bruni, N., Montano, S., Zitoun, C. & Mithieux, G. The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology* **117**, 132-139 (1999).
251. Pogson, C.I. & Smith, S.A. The activity of phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat tissues. Assay techniques and effects of dietary and hormonal changes. *Biochem J* **152**, 401-408 (1975).
252. Segata, N., *et al.* Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* **12**, R60 (2011).
253. Parks, D.H., Tyson, G.W., Hugenholtz, P. & Beiko, R.G. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics* **30**, 3123-3124 (2014).
254. Shi, H., *et al.* TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* **116**, 3015-3025 (2006).
255. Denou, E., *et al.* Defective NOD2 peptidoglycan sensing promotes diet-induced inflammation, dysbiosis, and insulin resistance. *EMBO molecular medicine* **7**, 259-274 (2015).
256. Kancherla, D., Gajendran, M., Vallabhaneni, P. & Vipperla, K. Metronidazole induced liver injury: a rare immune mediated drug reaction. *Case reports in gastrointestinal medicine* **2013**, 568193 (2013).
257. Tabak, F., *et al.* Ornidazole-induced liver damage: report of three cases and review of the literature. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **23**, 351-354 (2003).
258. Voigt, A.Y., *et al.* Temporal and technical variability of human gut metagenomes. *Genome biology* **16**, 73 (2015).
259. Zhang, X., *et al.* Structural changes of gut microbiota during berberine-mediated prevention of obesity and insulin resistance in high-fat diet-fed rats. *PloS one* **7**, e42529 (2012).

260. Zhang, X., *et al.* Modulation of gut microbiota by berberine and metformin during the treatment of high-fat diet-induced obesity in rats. *Scientific reports* **5**, 14405 (2015).
261. Ravussin, Y., *et al.* Responses of gut microbiota to diet composition and weight loss in lean and obese mice. *Obesity* **20**, 738-747 (2012).
262. Everard, A., *et al.* Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity. *The ISME journal* **8**, 2116-2130 (2014).
263. Booth, A.N., Taylor, J., Wilson, R.H. & Deeds, F. The inhibitory effects of itaconic acid in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry* **195**, 697-702 (1952).
264. Bervoets, L., *et al.* Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study. *Gut pathogens* **5**, 10 (2013).
265. Duca, F.A., *et al.* Replication of obesity and associated signaling pathways through transfer of microbiota from obese-prone rats. *Diabetes* **63**, 1624-1636 (2014).
266. Duca, F.A., *et al.* Statement of Retraction. Replication of Obesity and Associated Signaling Pathways Through Transfer of Microbiota From Obese-Prone Rats. *Diabetes* 2014;63:1624-1636. DOI: 10.2337/db13-1526. *Diabetes* **65**, 1447 (2016).
267. Smith, K., McCoy, K.D. & Macpherson, A.J. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Seminars in immunology* **19**, 59-69 (2007).
268. Lee, S.M., *et al.* Bacterial colonization factors control specificity and stability of the gut microbiota. *Nature* **501**, 426-429 (2013).
269. Cote, C.D., *et al.* Resveratrol activates duodenal Sirt1 to reverse insulin resistance in rats through a neuronal network. *Nature medicine* **21**, 498-505 (2015).
270. Kim, M.S. & Bae, J.W. Spatial disturbances in altered mucosal and luminal gut viromes of diet-induced obese mice. *Environmental microbiology* **18**, 1498-1510 (2016).